

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberación controlada en células senescentes

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: Regina Bou Puerto

TUTOR: José Ramón Murguía Ibáñez

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 7 de julio de 2015



Título del TFG

Diseño racional y caracterización de nanodispositivos de sílice mesoporosa para liberación controlada en células senescentes.

Autora

Regina Bou Puerto

Titulación

Grado en Biotecnología

Tutor

José Ramón Murguía Ibáñez

Fecha y localidad de lectura

Valencia, julio de 2015

ABSTRACT

The main goal of the current project is the development and validation, in a cellular model of senescence, of mesoporous silica nanoparticles (MSNs) functionalized with galacto-oligosaccharides (GOS) which can selectively deliver their cargo in senescent cells.

Cellular senescence is a state in which cells enter an irreversible cell cycle arrest and acquire an altered phenotype characterized by hyper-secretion. It is a process triggered by stress and cellular damage, and it constitutes an alternative route to programmed cell death to avoid cell damage progression. However, accumulation of these cells alters tissue structure, being associated to aging and related diseases, cancer or idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). All together, it is necessary to develop therapeutic strategies selectively targeting senescent cells.

The use of MSNs as controlled drug delivery system has been extensively exploited recently due to the advantages they show. Among them, biocompatibility, thermal and chemical stability, homogeneous pore volume, high specific surface area to contain greater amounts of drugs and the possibility of surface functionalization with biomolecules acting as molecular gates, are highlighted. Molecular gates are supramolecular devices (DNA, peptides, synthetic molecules, polymers...) in which mass transfer is initiated by an external stimuli, in such a way that molecules previously loaded into the mesopores of MSN are released.

Concretely, our group has developed a nanodevice able to deliver small molecules targeting senescent cells. It is based in mesoporous silica nanoparticles functionalized with galacto-oligosaccharides as molecular gate. Senescent cells targeting is achieved thanks to incremented β -galactosidase activity (SA- β -gal). However, in the present work a proof of

concept is proposed to demonstrate that specificity achieved by our nanodevice is not only due to SA- β -gal, but also to the presence of GOS receptors in senescent cells surface.

The nanodevice functionalized with GOS was structurally and functionally validated, showing specificity for senescent cells. Finally, we were able to demonstrate, through a proof of concept, that senescent cells show an increased expression of galacto-saccharides receptors which ease the endocytosis of the synthesized nanoparticle. Such knowledge could bring valuable information to develop in a future nanodevices functionalized with more selective GOS for senescent cells loaded with cytotoxic compounds, and use these nanodevices to treat diseases such as cancer.

Key words

Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs), cellular senescence, targeting.

RESUMEN

El objetivo principal del presente TFG es el desarrollo y validación, en un modelo celular de senescencia, de materiales mesoporosos de sílice (MSNs) funcionalizados con galacto-oligosacáridos (GOS) que puedan liberar su carga de forma selectiva en las células senescentes.

La senescencia celular es una condición en la que las células presentan un estado de arresto irreversible del ciclo celular y un fenotipo alterado hipersecretor. Se trata de un proceso que se inicia como respuesta al estrés y daño celular, y constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada para evitar la progresión del daño. Sin embargo, la acumulación de dichas células altera la arquitectura tisular, estando relacionada con el envejecimiento y patologías relacionadas, cáncer o fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Por todo ello, es necesario disponer de estrategias terapéuticas dirigidas que eliminen las células senescentes selectivamente.

El empleo de MSNs como sistema de entrega controlada y dirigida de fármacos ha sido extensamente explotado recientemente debido a las múltiples ventajas que presentan. Entre estas destaca su biocompatibilidad, estabilidad térmica y química, volumen de poro homogéneo, alta superficie específica para albergar mayor cantidad de fármaco y la posibilidad de funcionalizar su superficie con biomoléculas que actúen como puerta molecular. Las puertas moleculares son dispositivos supramoleculares (DNA, péptidos, moléculas sintéticas, polímeros, etc.) en los que existe un transporte de materia iniciado por un estímulo externo,

de forma que tras dicho estímulo se liberan las moléculas previamente atrapadas en los mesoporos del material MSN.

Concretamente, nuestro grupo ha desarrollado un nanodispositivo que tiene la capacidad de liberar de forma controlada moléculas pequeñas exclusivamente en células senescentes. Dicho nanodispositivo se basa en nanopartículas mesoporosas de sílice, funcionalizadas con galacto-oligosacáridos como puerta molecular. La especificidad hacia las células senescentes se consigue gracias a la actividad aumentada β -galactosidasa asociada a dichas células (SA- β -gal).

Sin embargo, en el presente trabajo se plantea una prueba de concepto para demostrar que la especificidad conseguida con los nanodispositivos sintetizados no se debe únicamente a SA- β -gal, sino que se hipotetiza la existencia de receptores específicos por GOS en la superficie de las células senescentes.

El nanodispositivo funcionalizado con GOS fue validado estructural y funcionalmente, mostrando especificidad por las células senescentes. Finalmente, se ha podido demostrar mediante una prueba de concepto que en las células senescentes existe una expresión/sobreexpresión de receptores de galacto-azúcares que posibilitan la endocitosis de la nanopartícula sintetizada. Dicho conocimiento podría permitir en un futuro el desarrollo de nanodispositivos funcionalizados con GOS más selectivos cargados con compuestos citotóxicos para las células senescentes como nanoterapia para tratar enfermedades como el cáncer.

Palabras clave

Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSNs), senescencia celular, *targeting*.



AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, dar las gracias a Joserra por brindarme esta oportunidad. Sabes cómo venderte bien, pero aun así no haces justicia al mundo “nano”: es mucho más emocionante y prometedor de lo que se puede imaginar o explicar con palabras. También agradecer a Ramón que me acogiese en el grupo con los brazos abiertos, trabajar en él ha sido una de las mejores decisiones de mi todavía corta carrera biotecnológica.

También quiero aprovechar la ocasión para agradecer a la Asociación Española Contra el Cáncer, no solo a título personal por la beca que me concedieron, sino sobre todo por apostar por la investigación y los jóvenes españoles. Ese es el camino a seguir para ganar la batalla contra el cáncer.

Cómo no, gracias a todas las chicas (y algún que otro chico) del Lab de Nanomedicina, y a toda la gente del 2.6. Por los almuerzos, los consejos, la “IDM Fashion Week” y las risas, sobre todo en los momentos de máxima desesperación experimental. Todo el sufrimiento y horas de trabajo han merecido la pena sólo por conoceros y haber aprendido tanto de vosotros.

Finalmente y no por ello menos importante...

Gracias infinitas al “Equipo Senescencia”. Cris, Irene, ha sido un placer trabajar con vosotras. Irene, que ha sido mi cotutora en la sombra y no se ha podido llevar ese reconocimiento. Me habéis dejado el listón muy alto, ahora va a ser muy difícil encontrar unas compañeras de laboratorio, profes y amigas tan buenas. Ojalá todo el mundo fuese igual de competente, de agradable, de inspirador, como lo sois vosotras. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto dentro como fuera del lab (sí, home). Vos trovaré a faltar! ¿Qué pasará, qué misterio habrá? ¡Vuestro Patito no os olvida!

Por supuestísimo, gracias a mi familia. Gracias por la educación que me habéis dado y que me ha permitido llegar hasta aquí. Mis padres, mi ejemplo a seguir, mi motivación. Bicho, tú entras en esta familia. Ellos, que se alegran más de mis victorias que yo misma, el pilar inamovible de mi vida. Prometo ser siempre una buena inversión y alguien de quien os sintáis orgullosos.

Y para acabar... Gracias a La Pegatina. Vuestra música y vuestro buen rollo amenizan cualquier tarea, ¡incluso el análisis de infinitas imágenes de confocal!

ÍNDICE

| | |
|---|---------------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | - 1 - |
| 1.1 SENESCENCIA CELULAR..... | 3 |
| 1.1.1 Mecanismos de inducción de senescencia..... | 3 |
| 1.1.2 Características fenotípicas de las células senescentes..... | 4 |
| 1.1.3 Senescencia en fisiología y patología..... | 4 |
| 1.1.4 Terapias anti-senescentes..... | 6 |
| 1.2 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA..... | 6 |
| 1.2.1 Nanodispositivos como sistema controlado de liberación de fármacos..... | 6 |
| 1.2.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSNs)..... | 7 |
| 1.2.3 Puertas moleculares..... | 8 |
| 2. OBJETIVOS..... | - 9 - |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | - 13 - |
| 3.1 EQUIPOS..... | 15 |
| 3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS NANOPARTÍCULAS | |
| S1-GAL Y S1-GLU..... | 15 |
| 3.2.1 Reactivos..... | 15 |
| 3.2.2 Composición de los polisacáridos empleados como puertas moleculares.... | 15 |
| 3.2.3 Síntesis de la estructura mesoporosa inorgánica de sílice MCM-41..... | 16 |
| 3.2.4 Carga del material MCM-41 con rodamina B: obtención de los sólidos S1.... | 17 |
| 3.2.5 Funcionalización de los sólidos S1 para obtener S1-GAL y S1-GLU: | |
| anclaje de la puerta molecular..... | 18 |
| 3.2.6 Caracterización de los sólidos S1-GAL y S1-GLU..... | 19 |
| 3.3 VALIDACIÓN FUNCIONAL: ENSAYOS DE LIBERACIÓN IN VITRO DE LOS | |
| MATERIALES HÍBRIDOS..... | 20 |
| 3.3.1 Reactivos..... | 20 |
| 3.3.2 Ensayos de liberación <i>in vitro</i> | 20 |

| | |
|---|-------------------|
| 3.4 ENSAYOS CELULARES..... | 21 |
| 3.4.1 Reactivos..... | 21 |
| 3.4.2 Línea celular, condiciones de cultivo y siembra..... | 22 |
| 3.4.3 Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno en células ITM y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal..... | 23 |
| 3.4.4 Ensayo de viabilidad con los sólidos finales S1-GAL y S1-GLU..... | 24 |
| 3.4.5 Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes..... | 26 |
| 3.4.6 Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa..... | 28 |
| 3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 29 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | - 31- |
| 4.1 VALIDACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE S1-GAL Y S1-GLU..... | 34 |
| 4.2 ENSAYOS CELULARES..... | 39 |
| 4.2.1 Comprobación del modelo celular de senescencia..... | 39 |
| 4.2.2 Estudio de viabilidad celular con S1-GAL y S1-GLU..... | 41 |
| 4.2.3 Internalización y apertura de S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes..... | 42 |
| 5. CONCLUSIÓN..... | - 47 - |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | - 51 - |
| 7. ANEXOS..... | - 57- |
| 7.1 PÓSTER “GALACTO-OLIGOSACCHARIDE-GATED SILICA NANOPARTICLES FOR TARGETING SENESCENT CELLS” PRESENTADO EN “IX INTERNATIONAL WORKSHOP ON SENSORS AND MOLECULAR RECOGNITION” | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Esquema por días del ensayo ‘Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal’ | 24 |
| Tabla 2. Esquema por días del ensayo ‘Ensayo de viabilidad con los sólidos S1-GAL y S1-GLU’ | 25 |
| Tabla 3. Esquema por días del ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes’ | 27 |
| Tabla 4. Esquema por días del ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa’ | 29 |
| Tabla 5. Tamaño, volumen de poro (calculados mediante el método BJH) y superficie específica de poro (calculada mediante el modelo BET) de MCM-41 calcinada, S1-GAL y S1-GLU | 37 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Mecanismos moleculares de senescencia celular..... | 3 |
| Figura 2. Modelo de senescencia..... | 5 |
| Figura 3. Funcionalización de MSNs..... | 7 |
| Figura 4. Estructura de los materiales mesoporosos de la familia M41S..... | 8 |
| Figura 5. Estructura química básica de Galactan y Glucidex-47..... | 16 |
| Figura 6. Esquema de la síntesis del nanodispositivo mesoporoso de sílice MCM-41..... | 17 |
| Figura 7. Estructura química de la rodamina B..... | 18 |
| Figura 8. Estructura química del 4-hidroxitamoxifeno (4OHT)..... | 22 |
| Figura 9. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal’..... | 23 |
| Figura 10. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Ensayo de viabilidad con los sólidos S1-GAL y S1-GLU’..... | 25 |
| Figura 11. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes’..... | 27 |
| Figura 12. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa’..... | 28 |
| Figura 13. Esquema de una MCM-41 cargada con rodamina B y funcionalizada con un galacto-oligosacárido..... | 34 |
| Figura 14. Difractograma de rayos X en polvo de MCM-41 sin calcinar a), MCM-41 calcinada b), S1-GAL c) y S1-GLU d)..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| Figura 15. Fotografías representativas de MCM-41 sin calcinar a), MCM-41 calcinada b), S1-GAL c) y S1-GLU d), obtenidas por TEM..... | 36 |
| Figura 16. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de la MCM-41 calcinada a), S1-GAL b) y S1-GLU c)..... | 36 |
| Figura 17. Liberación de rodamina B en S1-GAL (izquierda) y S1-GLU (derecha), en presencia y ausencia (blanco) de los enzimas β-galactosidasa y pancreatina respectivamente..... | 38 |
| Figura 18. Reacción de hidrólisis de X-Gal por el enzima β-galactosidasa y liberación de un compuesto azulado..... | 40 |
| Figura 19. Imágenes representativas de la tinción con X-Gal de células no senescentes (sin 4OHT, a, b y c) y senescentes (con 4OHT, d, e y f)..... | 41 |
| Figura 20. Ensayo de viabilidad de células senescentes (+ 4OHT) y no senescentes (sin 4OHT) incubadas con S1-GAL (50 µg/mL) y S1-GLU (50 µg/mL) durante 24 horas..... | 41 |
| Figura 21. Liberación de rodamina B en células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+ 4OHT) empleando las nanopartículas S1-GAL y S1-GLU (50 µg/mL)..... | 43 |
| Figura 22. Fotografías representativas de células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+ 4OHT) incubadas 6 horas con S1-GAL a), S1-GLU b), y sin nanopartículas c), tomadas al microscopio confocal..... | 44 |
| Figura 23. Liberación de rodamina B en células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+ 4OHT) pre-tratadas con lactosa empleando el sólido S1-GAL (50 µg/mL)..... | 45 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| 4OHT | 4-hidroxitamoxifeno |
| APTES | 3-aminopropiltrietoxisilano |
| BET | Brunauer-Emmett-Teller |
| BJH | Barrett-Joyner-Halenda |
| BrdU | 5-bromodeoxiuridina |
| CNIO | Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas |
| CTAB | n-cetiltrimetilamonio |
| DAPI | 4',6-diamino-2-fenilindol |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DDR | Respuesta al daño al DNA |
| DDS | Sistema de entrega de fármacos |
| DRX | Difracción de rayos X en polvo |
| EDTA | Ácido etildiaminotetraacético |
| FBS | Suero bovino fetal |
| GOS | Galacto-oligosacáridos |
| HDF | Fibroblastos diploides humanos |
| hTERT | Unidad catalítica de la telomerasa humana |
| ICMUV | Instituto de Ciencia de los Materiales de la Universidad de Valencia |
| IDM | Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico |
| IL-6, 8 | Interleuquina-6, 8 |
| IPF | Fibrosis pulmonar idiopática |
| ITM | Línea celular empleada como modelo de senescencia |
| MCM-41 | Mobil Crystalline Material 41 |
| MIP | Proteínas inflamatorias de macrófagos |
| MSN | Nanopartículas Mesoporosas de Sílice |
| NF-κB | Factor nuclear κB |
| OIS | Senescencia inducida por oncogén |
| PBS | Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified |
| PFA | Paraformaldehído |
| Rb | Proteína del retinoblastoma |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| s | Desviación estándar |

| | |
|----------------------------------|---|
| S1-GAL | Sólido cargado con rodamina B y funcionalizado con el oligosacárido Galactan |
| S1-GLU | Sólido cargado con rodamina B y funcionalizado con el oligosacárido Glucidex-47 |
| SA-β-gal | Actividad β -galactosidasa asociada a senescencia |
| SAHF | Foci de heterocromatina asociado a senescencia |
| SASP | Fenotipo secretor asociado a senescencia |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
| TEOS | Tetraetilortosilicato |
| TG | Análisis termogravimétrico |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante β |
| UCM | Universidad Complutense de Madrid |
| UV/V | Ultravioleta/Visible |
| UPV | Universidad Politécnica de Valencia |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido |

1 | INTRODUCCIÓN

1.1 SENESCENCIA CELULAR

La senescencia celular es un estado estable de arresto del ciclo celular, en el que las células detienen su proliferación y adquieren un fenotipo alterado, como se describirá a continuación. Fue descrita por primera vez en fibroblastos diploides humanos (HDF) cultivados *in vitro* (Hayflick & Moorhead, 1961) como consecuencia del acortamiento de los telómeros tras sucesivas replicaciones, por lo que se conoce como senescencia replicativa (Campisi, 1997; Harley *et al.*, 1990; Hayflick, 1965). Hoy en día se conocen más mecanismos diferentes a la senescencia replicativa que desencadenan el fenotipo senescente, como se mencionará en este trabajo, de entre los cuales destaca la senescencia inducida por oncogén (OIS) (Serrano *et al.*, 1997). Asimismo, se ha conseguido relacionar la senescencia celular con condiciones fisiológicas normales, pero también patológicas, de forma que en ciertas enfermedades actúa como un mecanismo de defensa para detener la progresión de la patología, mientras que en otras contribuye a su desarrollo, dualidad conocida como pleiotropía antagonista (revisado por Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Campisi, 1997). Así, la senescencia celular emerge como un arma de doble filo, en la que terapias pro-senescentes ayudan a combatir enfermedades, pero deben ir combinadas con posteriores tratamientos anti-senescentes (Campisi, 2005; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Nardella *et al.*, 2011).

1.1.1 Mecanismos de inducción de senescencia.

Actualmente se conocen nuevos mecanismos de inducción de senescencia diferentes al constituido por el acortamiento de los telómeros. Algunos de los desencadenantes de senescencia aparecen esquematizados en la Figura 1.

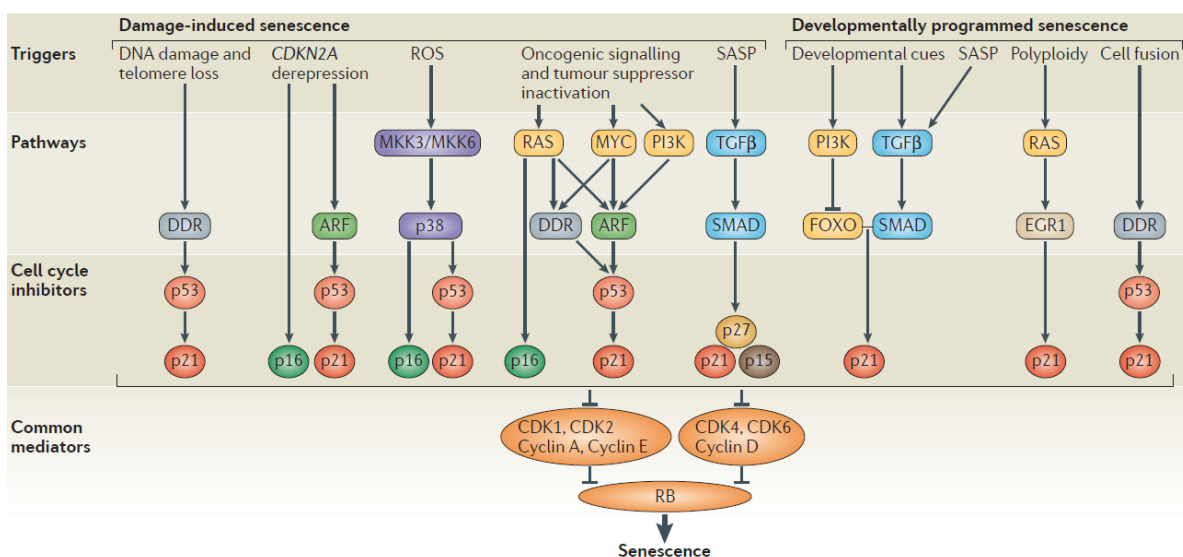


Figura 1. Mecanismos moleculares de senescencia celular. Las diferentes señales (acortamiento de telómeros, daño al DNA, activación de oncogenes) inducen el fenotipo senescente a través de proteínas inhibitoras del ciclo celular y del supresor tumoral proteína del retinoblastoma (Rb). ROS: especies reactivas de oxígeno. SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Estos nuevos mecanismos incluyen la inducción de senescencia como respuesta al daño al DNA (DDR), por estrés y especies reactivas de oxígeno (ROS), por perturbación de la cromatina, por señales mitogénicas fuertes, por derepresión del locus *CDKN2A* (que codifica para los inhibidores del ciclo celular p16 y ARF), inducida por oncogén, o incluso por la acción paracrina de otras células senescentes (por SASP) (revisado por Campisi & d'Adda di Fagagna (2007) y Muñoz-Espín & Serrano (2014)). En general, dichas causas convergen en la activación de genes supresores de tumores e inhibidores del ciclo celular como p16, p15, p21, p27 y la forma hipofosforilada de la proteína del retinoblastoma (Rb).

1.1.2 Características fenotípicas de las células senescentes.

A pesar de esta variedad en las causas de la inducción de senescencia, existen una serie de características fenotípicas y biomarcadores aceptados como comunes a las células senescentes. Estas características incluyen la ausencia de marcadores proliferativos (proteína Ki67 o no incorporación de 5-bromodeoxiuridina (BrdU)), expresión de inhibidores del ciclo celular y supresores de tumores (p16, p15, p21, p27, p53, Rb hipofosforilada, entre otros), un aumento en la actividad β -galactosidasa (*senescence-associated β -galactosidase*, SA- β -gal); marcadores de daño del DNA, focis nucleares de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF), un fenotipo hipersecretor pro-inflamatorio (*senescence-associated secretory phenotype* (SASP), con expresión de moléculas como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el factor nuclear κ B (NF- κ B), interleuquinas 6 y 8 (IL-6, IL-8) o proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP), entre muchas otras), alteraciones metabólicas o macroautofagia (Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Pérez-Mancera *et al.*, 2014). El conocimiento de estas características fenotípicas propias de las células senescentes es imprescindible para su detección y para el desarrollo de terapias dirigidas hacia estas células. Actualmente, de todas ellas, la actividad SA- β -gal adquiere especial relevancia, pues ha sido y es extensamente empleada para su detección (Dimri *et al.*, 1995).

1.1.3 Senescencia en fisiología y patología.

En condiciones fisiológicas, la senescencia juega un papel clave en la remodelación tisular. Actualmente se sabe que participa en el desarrollo embrionario, donde elimina estructuras transitorias y regula la proporción de diferentes tipos celulares (Muñoz-Espín *et al.*, 2013; Storer *et al.*, 2013), actuando como un mecanismo complementario a la apoptosis. Asimismo, se sabe que la senescencia ocurre también en tejidos adultos normales, siendo un mecanismo de maduración de megacariocitos (Besancenot *et al.*, 2010) y sincitiotrofoblastos de la placenta (Chuprin *et al.*, 2013).

Pero la senescencia no solo está presente en condiciones fisiológicas como las hasta ahora expuestas, sino que también se ha descrito en patologías. Muñoz-Espín & Serrano (2014) proponen que el fin último de la senescencia es contribuir a la eliminación de células dañadas, restringir la proliferación del daño tisular y promover la regeneración del tejido. La secuencia de pasos para conseguir tal propósito consiste en un primer paso de inducción de senescencia de las células dañadas, seguido de la eliminación de estas células senescentes por parte del sistema inmune (Hoenicke & Zender, 2012) – paso al que contribuye el fenotipo hipersecretor y pro-inflamatorio de dichas células – y finalmente regeneración del tejido dañado. En ese mismo artículo, los autores hacen una revisión de aquellas condiciones patológicas en las que se cumple dicha secuencia y la inducción de senescencia actúa como un mecanismo protector y de detención de la progresión de la patología, siendo algunos ejemplos la fibrosis hepática, renal, oral y cardíaca; la arteriosclerosis, la hipertensión pulmonar y el cáncer, en el cual la senescencia detiene la propagación de las lesiones pre-cancerosas.

Sin embargo no siempre se produce una eliminación efectiva de las células senescentes, debido tanto a la actuación defectuosa del sistema inmune como a la inducción de senescencia en células madre (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). Esta acumulación está fuertemente relacionada con el envejecimiento, pero también contribuye a otras enfermedades como la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), la obesidad, la diabetes tipo 2, las cataratas o incluso el cáncer, en el que a pesar de actuar inicialmente como una barrera contra su progresión, tras la acumulación de células senescentes su fenotipo hipersecretor (SASP) induce tumorigénesis (Pérez-Mancera *et al.*, 2014). Este concepto de la senescencia como arma de doble filo aparece reflejado en la Figura 2.

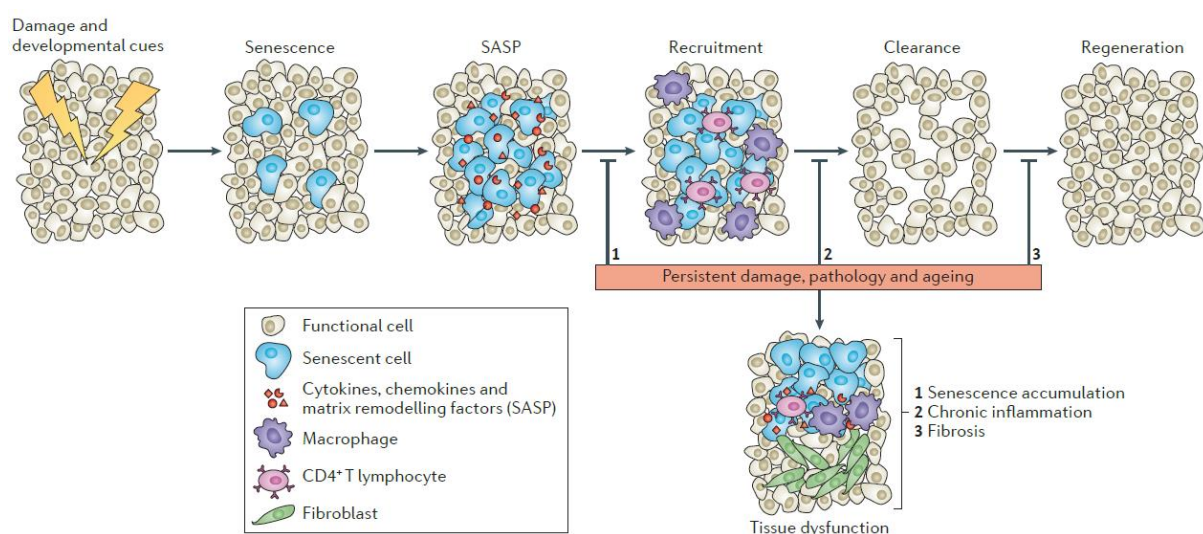


Figura 2. Modelo de senescencia. Tras el daño celular se induce senescencia como mecanismo de defensa, se recluta al sistema inmune gracias al SASP y se eliminan las células senescentes. Sin embargo, en ciertas patologías o por el envejecimiento se acumulan estas células y se produce disfunción tisular (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia.

1.1.4 Terapias anti-senescentes.

Este trabajo se centra en las terapias anti-senescentes, que buscan la eliminación de células senescentes para tratar patologías como el cáncer o la IPF. Actualmente los dos puntos de acción principales de estas terapias pasan por la inmunoterapia senescente y el diseño de pequeñas moléculas letales para las células senescentes, campo en el que se ha producido un gran avance al descubrir la fuerte demanda y dependencia energética que presentan las células senescentes, y que se puede explotar mediante inhibidores metabólicos del catabolismo de la glucosa (Dörr *et al.*, 2013; Ovadya & Krizhanovsky, 2014). Sin embargo, en cualquiera de los casos es necesario encontrar una estrategia que permita una terapia dirigida específicamente hacia células senescentes, sin que genere efectos secundarios en el resto del organismo. En este punto entra en juego la nanotecnología y la nanomedicina, ciencias capaces de aportar soluciones que cumplen estos requerimientos.

1.2 NANOTECNOLOGÍA Y NANOMEDICINA

La nanotecnología es la ciencia que, mediante la manipulación de átomos y moléculas, consigue construir estructuras de un tamaño nanométrico (100 nm o menos) con unas propiedades físicas y químicas únicas, a menudo mejores o radicalmente diferentes a las de la materia inicial (Climent Terol, 2012; Moghimi *et al.*, 2005).

Dentro de esta amplia disciplina surge la nanomedicina, una nueva rama de la nanotecnología que busca la aplicación de nanopartículas y nanomateriales para el tratamiento, diagnóstico, monitorización y control de sistemas biológicos (Moghimi *et al.*, 2005). Algunas de estas aplicaciones biomédicas incluyen el desarrollo de nanodispositivos como biosensores para el diagnóstico, nanopartículas magnéticas para imagen biomédica o biomateriales para implantes biomédicos (Wagner *et al.*, 2006). Sin embargo, la vanguardia en el mundo de la nanomedicina es el empleo de nanodispositivos para conseguir la entrega dirigida y controlada de fármacos de manera específica (Moghimi *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2006).

1.2.1 Nanodispositivos como sistema controlado de liberación de fármacos.

Existe una amplia variedad de nanodispositivos que permiten la entrega y liberación de fármacos (*drug delivery system*, DDS), como son polímeros, liposomas, dendrímeros, micelas poliméricas, nanopartículas derivadas de cápsula de virus o nanopartículas cerámicas (Bawarski *et al.*, 2008; Moghimi *et al.*, 2005).

Estos nanotransportadores aportan un gran número de ventajas respecto al uso de fármacos en formulación libre. Mediante la nanoformulación de moléculas terapéuticas se

consigue mejorar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, se aumenta su solubilidad y su biodisponibilidad y se consigue un efecto terapéutico más inmediato reduciendo además los efectos secundarios (Medvedeva *et al.*, 2007; Vallet-Regí *et al.*, 2007).

Concretamente, en el presente trabajo se emplearán nanopartículas mesoporosas de sílice como dispositivos para un tratamiento dirigido. Estos nanodispositivos presentan ventajas adicionales además de las ya expuestas, que se desarrollarán con más detalle. Su reducido tamaño (entre 80 y 100 nm) permite traspasar barreras biológicas y una mayor penetración celular (Davis *et al.*, 2008; Medvedeva *et al.*, 2007), siendo posible por ejemplo que atraviesen la barrera hematoencefálica (Fiandra *et al.*, 2015). Además, y como se profundizará más adelante, este tipo de materiales permite su funcionalización con biomoléculas para dirigir las nanopartículas específicamente hacia células o tejidos diana, consiguiendo mejorar la efectividad farmacológica de moléculas terapéuticas y reducir sus efectos secundarios (Moghimi *et al.*, 2005; Slowing *et al.*, 2008).

1.2.2 Nanopartículas Mesoporosas de Sílice (MSNs).

Actualmente, los materiales mesoporosos de sílice (MSNs) surgen como naodispositivos de entrega y liberación de fármacos con mucho potencial (Vallet-Regí *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012). Esto se debe al gran número de ventajas que presentan para dicho fin, ampliamente revisado en la bibliografía. Por un lado, se trata de moléculas biocompatibles que no presentan toxicidad (Yang *et al.*, 2012). Además, son estables química y térmicamente (Slowing *et al.*, 2008). Por otro lado, este tipo de materiales se caracterizan por poseer una red ordenada y homogénea de poros (2-10 nm) que permiten un amplio control en la carga y la cinética de liberación del contenido de los nanodispositivos. Además, constan de un alto volumen de poro ($1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$) y superficie específica ($500\text{--}1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), permitiendo la carga y adsorción de mayores cantidades de fármaco. Finalmente, el hecho de presentar grupos silanoles (Si-OH) sin reaccionar en su superficie permite su funcionalización con moléculas y biomoléculas orgánicas, que permitan controlar la carga encapsulada en los poros y el proceso y lugar de su liberación (Figura 3). Finalmente, este tipo de materiales permiten un gran control en la estructura y porosidad del sólido final, a través del cambio de las condiciones de concentración, pH, temperatura o surfactante empleadas en la síntesis (Climent Terol, 2012; Vallet-Regí *et al.*, 2007).

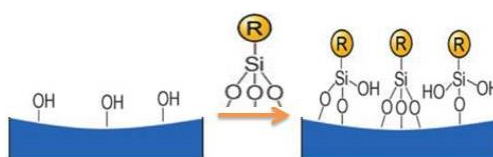


Figura 3. Funcionalización de MSNs. Los silanoles de MSNs reaccionan con grupos trialcoxilano (modificada de Hoffmann *et al.*, 2006).

De entre este tipo de materiales MSN, destacan las estructuras MCM-41, MCM-48 y MCM-50, que pertenecen a la familia mesoporosa M41S desarrollada en 1992 y presentan un diámetro de poro de entre 2 y 10 nm (Hoffmann *et al.*, 2006). En la Figura 4 aparecen representadas las estructuras de estos tres materiales. Concretamente el material MCM-41, con el que se trabajará en este proyecto, se empleó por primera vez como transportador de fármacos en 2001 (Vallet-Regi *et al.*, 2001).

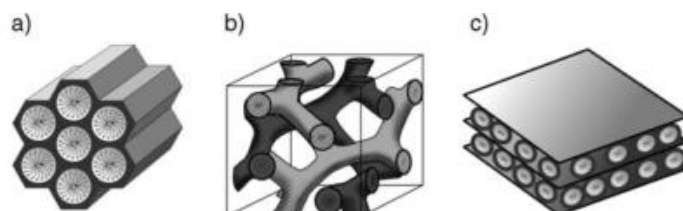


Figura 4. Estructura de los materiales mesoporosos de la familia M41S. a) MCM-41 con distribución hexagonal de poros; b) MCM-48 con distribución cúbica; y c) MCM-50 con estructura laminar (Hoffmann *et al.*, 2006).

1.2.3 Puertas moleculares.

El concepto de puerta molecular define un sistema nanoscópico capaz de controlar el transporte y entrega de materia, que se inicia en respuesta a un estímulo externo. Los nanodispositivos con puerta molecular constan de una estructura inorgánica, que aporta los poros en los que encapsular la carga de interés, funcionalizada con una puerta molecular externa que mantiene dicha carga encerrada y únicamente la libera tras la acción de un estímulo externo. Por tanto, estas puertas presentan un estado cerrado, en el que idealmente existe una liberación cero; y otro abierto, en el que únicamente tras la aplicación de un estímulo externo la puerta se abre y libera el contenido atrapado en los poros de los materiales MSNs (Coll *et al.*, 2013; Climent Terol, 2012).

Estas puertas moleculares pueden ser de naturaleza muy diversa (péptidos, sacáridos, DNA, polímeros...), obteniéndose como resultado un material híbrido orgánico-inorgánico. Asimismo, se han descrito un amplio abanico de sistemas con puertas moleculares capaces de responder a estímulos muy diversos (pH, temperatura, luz, presencia de enzimas, potencial redox), ampliamente revisados en la bibliografía (Coll *et al.*, 2013; Climent Terol, 2012; Yang *et al.*, 2012; Slowing *et al.*, 2008).

Sumando toda la información hasta ahora expuesta, el diseño de un nanodispositivo mesoporoso de sílice funcionalizado con una biomolécula capaz de dirigirlo selectivamente hacia células senescentes se plantea como una estrategia terapéutica viable para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de dichas células.

2| OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Diseño, síntesis y caracterización estructural de dos nanodispositivos mesoporosos, cargados con el fluoróforo rodamina B y funcionalizados con distintos polisacáridos como puerta molecular.
2. Comprobación, *in vitro* e *in vivo* en un modelo celular de senescencia, del funcionamiento de los nanodispositivos.
3. Estudio de la especificidad de los nanodispositivos hacia células senescentes: evaluación de la posible presencia de receptores de azúcares (galectinas) específicos para galacto-oligosacáridos en células senescentes.

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 EQUIPOS

Para la síntesis y caracterización de las diferentes nanopartículas se empleó una mufla Furnace, un difractómetro Bruker D8 Advance, al analizador termogravimétrico TGA/SDTA 851e Mettler Toledo Balance, un espectrofotómetro de ultravioleta-visible (UV/V) JASCO V-650 UV-VIS Spectrophotometer, un microscopio electrónico de transmisión Philips CM10, un CE Instrument EA-1110 CHN Elemental Analyzer para el análisis elemental y un Micromeritics ASAP2010 Automated Sorption Analyser.

Además, para los ensayos de liberación *in vitro* e *in vivo* se recurrió a un espectrofotómetro de fluorescencia JASCO Spectrofluorometer FP-8500, a un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC Multimode Plate Reader, a un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 con cámara refrigerada DS-Ri1 y a un microscopio confocal Zeiss Axio Observer Z1 con detector LSM 780 (con 7 líneas de láser: 405, 458, 488, 514, 561, 594 y 633). La manipulación celular se llevó a cabo en una cabina de seguridad biológica clase II Telstar Bio II A con filtro HEPA y flujo laminar vertical. Las incubaciones se llevaron a cabo en una incubadora con CO₂ Forma Steri-Cycle de Thermo Scientific.

3.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS NANOPARTÍCULAS S1-GAL Y S1-GLU

El primer objetivo del presente trabajo consistió en llevar a cabo la síntesis de dos nanodispositivos de sílice mesoporosa, cargados con el colorante rodamina B y funcionalizados con dos polisacáridos distintos: Galactan y Glucidex-47. La síntesis se llevó a cabo siguiendo las indicaciones descritas en distintas publicaciones de miembros del grupo (Agostini *et al.*, 2012; Bernardos *et al.*, 2010; Coll *et al.*, 2013; Bernardos *et al.*, 2009).

3.2.1 Reactivos.

Los reactivos bromuro n-cetiltrimetilamonio (CTAB) ($\geq 99\%$), tetraetilortosilicato (TEOS) (98%), hidróxido de sodio (NaOH) ($\geq 98\%$), rodamina B, 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) (99%) y etanol anhidro fueron comprados a Sigma-Aldrich. El Galactan proviene de Santa Cruz Biotechnology, y el Glucidex-47 se adquirió de Roquette.

3.2.2. Composición de los polisacáridos empleados como puertas moleculares.

La elección de polisacáridos como puertas moleculares se debe a que estos compuestos son biocompatibles, fáciles de preparar y de bajo coste, y según su composición pueden presentar especificidad por ciertos tipos celulares, en este caso por las células senescentes debido a su

actividad β -galactosidasa. Todos los polisacáridos empleados estaban disponibles comercialmente, y su estructura se puede observar en la figura 5.

Así pues, Galactan es un oligosacárido formado por dos trisacáridos de galactosa unidos por un enlace σ -glicosídico. Por su parte, Glucidex-47 es un hidrolizado de almidón (polisacárido que consiste en un gran número de moléculas de glucosa unidas por enlaces σ -glicosídicos) que consta de un 5% de glucosa, 50% de maltosa y 45% de oligosacáridos y polisacáridos de glucosa.

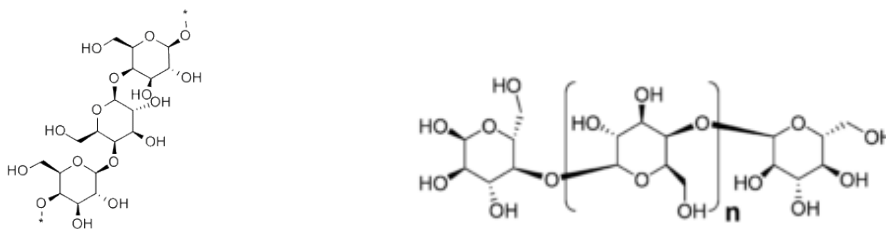


Figura 5. Estructura química básica de Galactan (izquierda, ChemicalBook CAS 39300-87-3) **y Glucidex-47** (derecha, Bernardos *et al.*, 2010).

3.2.3 Síntesis de la estructura mesoporosa inorgánica de sílice MCM-41.

Para la síntesis de la estructura MCM-41 se pesó 1 g (2.74 mmol) del surfactante CTAB y se añadieron 480 mL de agua desionizada en un vaso de precipitados, muy despacio para que no se crease espuma. Sobre una placa calefactora con un termopar para controlar la temperatura se aumentó la temperatura a 28°C con agitación para disolver totalmente el CTAB.

En ese momento se añadieron 3.5 mL de NaOH 2M en agua desionizada, rápidamente para evitar la carbonatación. Se tapó el vaso de precipitados en el que se producía la reacción con un vidrio de reloj y se ajustó la temperatura a 80°C, manteniendo la agitación.

Al llegar a los 80°C se añadieron 5 mL de TEOS (2.57×10^{-2} mol) gota a gota con una pipeta Pasteur. Cubierta con el vidrio de reloj, se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas a 80°C, manteniendo la agitación.

Tras este periodo se obtuvo un precipitado blanco, el cual fue centrifugado 20 minutos a 9500 rpm. Tras esta primera centrifugación se eliminó el sobrenadante y se lavó repetidamente el sólido con agua destilada hasta que se alcanzó un pH de 7 en las aguas de lavado. En este momento, se dejó secar el sólido MCM-41 a 60°C durante la noche para eliminar la humedad.

Finalmente se calcinó el material en la mufla para eliminar el CTAB y dejar libres los poros del sólido, para poder cargarlo posteriormente con el compuesto deseado. Para ello el programa de calcinación que se empleó consistió en llegar a 550°C y mantener esa temperatura durante 5 horas en atmosfera oxidante.

En resumen, se empleó una proporción molar de 2 TEOS: 0.52 CTAB: 0.5 NaOH: 180 H₂O para producir la estructura mesoporosa MCM-41. De manera más visual, en la figura 6 se puede observar cómo durante el proceso el surfactante CTAB forma micelas que se disponen en forma de cilindro y que adquieren una distribución hexagonal. Éste actúa como “template” alrededor del cual se condensa el precursor inorgánico TEOS. Finalmente, el surfactante es eliminado mediante calcinación, dejando disponibles los poros de la estructura MCM-41.

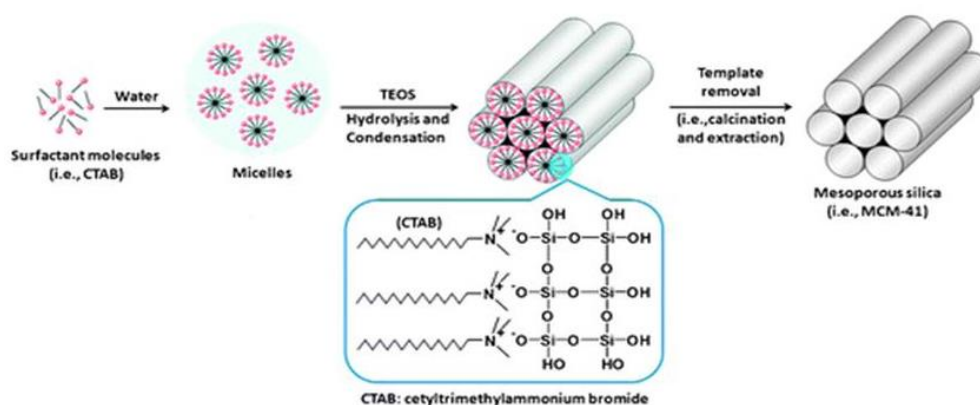


Figura 6. Esquema de la síntesis del nanodispositivo mesoporoso de sílice MCM-41. El surfactante CTAB forma micelas que se disponen en forma de cilindros con arreglo hexagonal, alrededor del cual se condensa el TEOS. Finalmente, el surfactante es eliminado por calcinación (modificada a partir de Yang *et al.*, 2012). TEOS: tetraetilortosilicato.

3.2.4 Carga del material MCM-41 con rodamina B: obtención de los sólidos S1.

A partir del material MCM-41 preparado se sintetizaron dos sólidos S1 diferentes, que posteriormente llamaremos S1-GAL y S1-GLU en función de la puerta molecular empleada en cada uno de ellos (Galactan en el primer caso, Glucidex-47 en el segundo). Los dos materiales sintetizados se cargaron con el colorante fluorescente rodamina B (Figura 7), que por sus características (ausencia de toxicidad celular, fácil cuantificación y posibilidad de encapsular en MCM-41) es idóneo para realizar ensayos de puesta a punto de nuevos sistemas y sirvió como marcador para detectar la liberación de la carga de las nanopartículas.

El proceso de carga fue ligeramente diferente para cada sólido. En ambos casos se pesaron 700 mg de MCM-41 y 268.25 mg de rodamina B (0.8 mmol rodamina B/g MCM-41). En el caso del sólido S1-GAL las nanopartículas y el colorante se resuspendieron en 56 mL de etanol (80 mL etanol/g MCM-41), mientras que en el caso de S1-GLU la suspensión se realizó en el mismo volumen pero de agua destilada (80 mL agua destinada/g MCM-41). La suspensión se dejó en un balón agitándose a temperatura ambiente durante 24 horas.

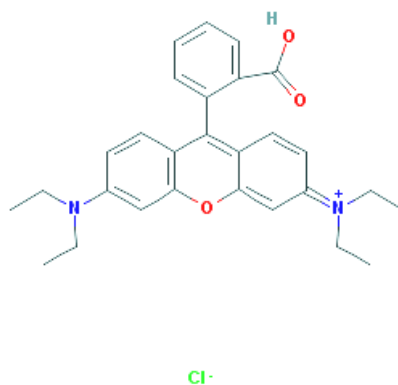


Figura 7. Estructura química de la rodamina B (PubChem CID: 6694).

3.2.5 Funcionalización de los sólidos S1 para obtener S1-GAL y S1-GLU: anclaje de la puerta molecular.

La funcionalización de los sólidos con los polisacáridos que actúan como puerta molecular se llevó a cabo mediante previa reacción de derivatización. Esto significa que se hizo reaccionar primeramente el grupo amina del APTES con los oligosacáridos Galactan y Glucidex-47, obteniéndose así un producto derivado que posteriormente se ancló a la superficie del sólido S1.

Para llevar a cabo la reacción de derivatización el primer paso consistió en poner a vacío 1 gramo de cada sacárido durante unas horas, para eliminar la humedad. A continuación, a cada balón que contenía el sacárido se le añadieron 50 mL de etanol, en atmósfera de nitrógeno y agitación a temperatura ambiente. Tras la disolución de los azúcares se añadieron 1.17 mL de APTES (10 mmol APTES/g MCM-41), y se dejaron transcurrir ambas reacciones durante 24 horas en agitación. Tras esto se aumentó la temperatura a 40°C en el caso del balón con Galactan y se mantuvo durante 1 hora, y a 60°C en el del Glucidex-47, durante 30 minutos. Finalmente, se eliminaron los disolventes de ambas reacciones mediante rotavaporación, y los productos resultantes se mantuvieron a vacío durante la noche.

A continuación se procedió a llevar a cabo el anclaje de las puertas moleculares recién sintetizadas a los sólidos S1. En el caso del sólido S1-GAL se añadieron 3.5 mg del producto Galactan derivatizado, previamente molturado, a su respectiva reacción de carga de la MCM-41 descrita en el apartado 3.2.3 (5 g producto/g MCM-41). En el caso del sólido S1-GLU se añadieron 0.7 mg del producto Glucidex-47 derivatizado y molturado a su respectiva reacción de carga de MCM-41 (apartado 3.2.3) (1 g/g MCM-41). Estas suspensiones se mantuvieron en agitación durante 24 horas y se centrifugaron posteriormente durante 10 minutos a 9500 rpm para recuperar los sólidos S1-GAL y S1-GLU, que se secaron en estufa a 37°C. Finalmente las nanopartículas obtenidas se lavaron con agua mediante repetidas filtraciones (para eliminar

los restos de rodamina B adheridos a la superficie externa de las nanopartículas) y se secaron a vacío, obteniéndose así los sólidos S1-GAL y S1-GLU finales.

3.2.6 Caracterización de los sólidos S1-GAL y S1-GLU.

Una vez obtenidos los sólidos finales, la MCM-41 sin calcinar y calcinada y los sólidos S1-GAL y S1-GLU se analizaron para comprobar la correcta síntesis, carga y funcionalización de los materiales, así como para ver si presentaban las propiedades características de este tipo de materiales. La caracterización constó de un análisis de difracción de rayos X en polvo (DRX), análisis termogravimétrico (TG), cuantificación de la carga de rodamina B por espectroscopía UV/V y microscopía electrónica de transmisión (TEM), realizados en el Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV); estudio de adsorción-desorción de N_2 en la Universidad Complutense de Madrid (UCM); y análisis elemental en el Instituto de Ciencia de los Materiales de la Universidad de Valencia (ICMUV).

El análisis de difracción de rayos X se realizó para los cuatro sólidos. Se empleó un difractómetro Bruker D8 Advance con radiación CuK_{α} . Unos 200 mg de cada sólido (en caso de disponerse de ellos, o en su defecto la cantidad máxima posible) se molturaron y colocaron formando una pastilla en el disco del equipo. El programa empleado utiliza unas ventanas de bajo ángulo (ventana de divergencia de 0.2 mm, ventana de dispersión de 3 mm y ventana del detector de 1 mm), sin giro de la muestra, con una duración de 11 minutos.

El análisis termogravimétrico realizado a los sólidos finales para calcular la cantidad de materia orgánica que contenían se llevó a cabo en un analizador de Mettler Toledo en atmósfera oxidante (aire, 80 mL/min). El programa de calor empleado consistió en una rampa de 10 grados/min, comenzando en 393 K y acabando en 1273 K, y 30 minutos isotérmicos a 1273 K.

El cálculo de la carga de rodamina en los sólidos S1 finales se llevó a cabo mediante la cuantificación de la cantidad de rodamina perdida en las aguas de carga y lavado de los sólidos, y su sustracción a la cantidad de rodamina inicial añadida a la reacción de carga de las nanopartículas. La cuantificación se llevó a cabo por espectroscopía de ultravioleta-visible en un equipo JASCO V-650.

Las imágenes de TEM de las 4 nanopartículas para observar su estructura a nivel microscópico fueron obtenidas en el Servicio de Microscopía de la UPV, en un microscopio Philips CM10. Para la preparación de las muestras se suspendió una pequeña cantidad de cada sólido en dicloroetano, y unas gotas de dicha suspensión se depositaron sobre una rejilla de

cobre recubierta de 300 mallas de carbono, quedando listas para su observación una vez se secó el disolvente.

Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ para los cuatro sólidos se obtuvieron en el equipo Micromeritics ASAP2010 Automated Sorption Analyser del ICMUV, previa desgasificación de las muestras a vacío a 120°C durante la noche. Los resultados devueltos incluyen la distribución del tamaño de poro, calculado siguiendo el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (Barrett *et al.*, 1951), y el área de superficie específica a partir de los datos de adsorción en el rango de presiones menores empleando el modelo Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Brunauer *et al.*, 1938).

El análisis elemental para determinar el contenido en carbono, nitrógeno e hidrógeno de S1-GAL y S1-GLU se llevó a cabo en un equipo CE Instrument EA-1110 CHN Elemental Analyzer en el Centro de Microanálisis Elemental de la UCM.

3.3 VALIDACIÓN FUNIONAL: ENSAYOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO* DE LOS MATERIALES HÍBRIDOS

Tras la caracterización estructural de los sólidos se llevó a cabo la validación funcional, que se realizó mediante estudios de liberación de rodamina B *in vitro*. Para ello se emplearon estímulos capaces de provocar la liberación de la carga de los sólidos por rotura de la puerta molecular, el enzima β -galactosidasa en el caso de S1-GAL y pancreatina de S1-GLU.

3.3.1 Reactivos.

Las enzimas β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y pancreatina de páncreas porcino, que serán los estímulos para la ruptura de los polisacáridos que actúan como puerta molecular, se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

3.3.2 Ensayos de liberación *in vitro*.

Para llevar a cabo las pruebas de liberación *in vitro* de los materiales sintetizados, el primer paso fue preparar las disoluciones enzimáticas. Para ello, por un lado se disolvieron 300 μ L de la enzima β -galactosidasa en 9.7 mL de agua destilada a pH 7.5, y por otro lado 30 mg de la enzima pancreatina en 7.5 mL de agua destilada a pH 7.5 (4 mg/mL).

A continuación, 6.25 mL de cada disolución enzimática se llevaron a 25 mL con agua destilada a pH 7.5. A estas disoluciones enzimáticas se les añadieron 10 mg de nanopartículas (S1-GAL en el caso de la disolución con β -galactosidasa, y S1-GLU en el caso de la de pancreatina), y se suspendieron mediante una breve sonicación. De manera paralela, 10 mg de

cada nanopartícula se suspendieron en 25 mL de agua destilada a pH 7.5 sin enzima, para actuar como blanco sin liberación.

Las cuatro reacciones se pusieron en agitación a 200 rpm. A partir de ese momento se fueron tomando alícuotas de 1 mL a diferentes tiempos (1 min, 2.5, 4, 7.5 y 24 horas), que se filtraron en filtros de teflón (PTFE 17 mm, 0.45 μ m).

Finalmente, se midió la fluorescencia de cada alícuota en un espectrofotómetro JASCO FP-8500 para determinar la liberación de rodamina B que se había producido, empleando la longitud de onda de emisión característica del colorante ($\lambda_{\text{excitación}} = 555 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 580 \text{ nm}$).

3.4 ENSAYOS EN UN MODELO CELULAR DE SENESCENCIA

Finalmente se pretendió validar el funcionamiento de los sólidos S1-GAL y S1-GLU sintetizados y caracterizados en un modelo celular de senescencia. Para ello, en primer lugar se llevaron a cabo ensayos de inducción de senescencia para comprobar la idoneidad del modelo celular, así como se comprobó la ausencia de toxicidad de los sólidos en las células.

Una vez el modelo celular estuvo puesto a punto, se emplearon los sólidos para evaluar la presencia de receptores de azúcares específicos para galacto-oligosacáridos en células senescentes. Para comenzar se estudió el nivel de internalización normal de ambos sólidos por parte de células senescentes y no senescentes, mediante la cuantificación de la liberación de rodamina B en las células por microscopia confocal. A continuación, y como prueba de concepto, se estudió si dicha internalización se veía afectada por la adición previa de un azúcar con galactosa en su composición (como la lactosa), para determinar si éste era capaz de bloquear los receptores de azúcares y por tanto afectaba a la internalización de nanopartículas en las células.

3.4.1 Reactivos.

El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium 1X sin rojo fenol (DMEM), la tripsina-EDTA 0.05% (1X), el suero bovino fetal (FBS) y el antibiótico-antimicótico 100X (compuesto por penicilina, estreptomycin y anfotericina B) fueron adquiridos de Gibco Life Technologies. Sigma-Aldrich proporcionó el Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified (PBS), Trypan Blue, el colorante cristal violeta, la lactosa, el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el paraformaldehído (PFA) y el análogo de estrógenos 4-hidroxitamoxifeno (4OHT). De Scharlau se adquirió el etanol, y de Calbiochem el mowiol 4-88. El kit de tinción de células senescentes *Senescence β -galactosidase Staining Kit* se obtuvo de CellSignalling.

3.4.2 Línea celular, condiciones de cultivo y siembra.

La línea celular empleada fue ITM (fibroblastos pulmonares humanos), proporcionada amablemente por el Dr. Manuel Serrano del grupo de Supresión Tumoral del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid (España). Esta línea deriva de la línea primaria IMR-90, inmortalizada mediante la expresión forzada de la unidad catalítica de la telomerasa (hTERT), la cual presenta actividad transcriptasa inversa (Bodnar *et al.*, 1998; Collado *et al.*, 2005; Vaziri & Benchimol, 1998). Además, esta nueva línea denominada IT ha sido transducida retroviralmente con una versión inducible del oncogén MEK1, que se encuentra fusionado a un dominio de unión a hormonas del receptor de estrógenos humano (fusión MEK-ER), consiguiendo finalmente la línea celular ITM. De esta forma, mediante inducción del dominio ER se consigue la activación del oncogén y se desencadena una respuesta de OIS. Dicho dominio de unión a hormonas está modificado para no responder a estrógenos, sino al fármaco 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) (Figura 8), un antagonista del receptor de estrógenos. Así, al adicionar el compuesto 4OHT en la línea celular ITM se consigue un modelo de senescencia celular en 72 horas, apropiado para este trabajo (Collado *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 1998).

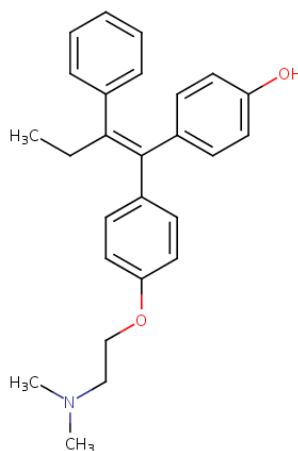


Figura 8. Estructura química del 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) (DrugBank, Accession Number DB04468).

Las células se cultivaron en medio DMEM sin rojo fenol suplementado con 10% FBS (o 0.5% según el ensayo celular) y 1% de antibiótico-antimicótico, a 37°C en atmósfera húmeda con 5% CO₂. La ausencia de rojo fenol se debe a que dicho compuesto interacciona con el receptor de estrógenos (fusión MEK-ER), desencadenando el fenotipo senescente en la presente línea celular.

El levantamiento de las células para realizar los subcultivos y siembras se llevó a cabo con 2 mL de tripsina y 5 minutos de incubación a 37°C. Los pases de mantenimiento se realizaron 3 veces por semana a diluciones 1:2 o 1:3 en función del grado de confluencia.

Las siembras se realizaron a partir de células que se encontraban en confluencia entre los pases 3 y 12. El cálculo de la concentración celular para las siembras se realizó mediante tinción con el colorante de exclusión Trypan Blue (para determinar viabilidad) y conteo en cámara Neubauer.

Para los ensayos en los que se recurrió a microscopía confocal, las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal para que pudiesen ser observadas y fotografiadas al microscopio.

Durante los periodos de incubación con 4OHT para inducción de senescencia se empleó medio suplementado con 0.5% FBS (en lugar de 10%) para evitar el crecimiento desmedido de las células vehículo (sin 4OHT) respecto a las células senescentes (con 4OHT), pues las segundas cesan su proliferación. También con este fin se sembró un menor número de células en los pocillos de células vehículo en la mayoría de los ensayos.

3.4.3 Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno en células ITM y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal.

Al comenzar a trabajar con la línea celular fue imprescindible realizar ensayos de inducción de senescencia para poder establecer el modelo de senescencia en el cual realizar los estudios con las nanopartículas sintetizadas. Para llevarlos a cabo, la línea celular ITM se sembró en placas multipocillo de 35 mm de diámetro (6 pocillos) sobre cubreobjetos circulares de cristal de 24 mm de diámetro, para que las células creciesen sobre ellos y poder así observarlas posteriormente al microscopio. La concentración de siembra fue de 60000 células/pocillo, 2 mL/pocillo, en medio DMEM suplementado con 10% FBS. El diseño de placa empleado en el ensayo aparece representado en la figura 9.

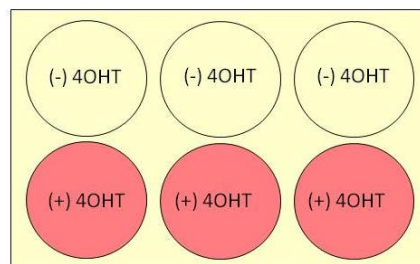


Figura 9. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo 'Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal'. La fila superior son células control tratadas con etanol (vehículo en el que está disuelto el 4OHT). La fila inferior son células a las que se les añadió 4OHT 100 nM para inducir senescencia. En ambos casos se sembraron 60000 células/pocillo.

Tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se cambió el medio a DMEM suplementado con 0.5% FBS, previo lavado con PBS, y se añadió el fármaco 4OHT a concentración 100 nM disuelto en etanol 96% para inducir senescencia. A las células control no

senescentes se les añadió el mismo volumen de etanol, pues era el vehículo en el que estaba disuelto el 4OHT, pero sin el fármaco.

Tras 72 horas de incubación bajo las condiciones descritas se procedió a la fijación de las células con PFA 4%, para poder realizar la tinción con el kit de detección de senescencia en el momento deseado. Para ello, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 10-15 minutos con 1 mL de PFA. Finalmente se retiró la solución de PFA, se lavó con PBS dos veces y se volvieron a añadir 2 mL de PBS nuevos, con los que se guardó la placa en nevera a 4°C hasta el día de su tinción, en caso de posponerse por disponibilidad de microscopía.

Para realizar la tinción se empleó el kit *Senescence β -Galactosidase Staining Kit*, de Cell Signalling Technologies, USA. Las soluciones se prepararon de acuerdo al protocolo de la casa comercial con los reactivos proporcionados en el kit. Es imprescindible ajustar el pH de la *β -galactosidase Staining Solution* a 6. Para proceder con la tinción se retiró el PBS en el que se encontraban las células y se añadió 1 mL de *β -Galactosidase Staining Solution* a cada pocillo. La placa se selló con parafilm para evitar la evaporación de la solución y se incubó durante la noche en estufa a 37°C. Pasada la incubación se retiró la solución de tinción y se lavó dos veces con PBS.

Finalmente se recuperaron los cubreobjetos de la placa con la ayuda de unas pinzas, se lavaron con agua destilada y se depositaron en un portaobjetos sobre una gota de mowiol. Finalmente se rodearon los cubreobjetos con laca de uñas para sellarlos al portaobjetos. Las células se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600, con cámara DS-Ri1.

El resumen del ensayo aparece recogido en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema por días del ensayo 'Inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno (4OHT) y comprobación mediante tinción con el sustrato colorimétrico X-Gal'.

| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
|------------|-------------------------|-------|-------|-------------------------------|---------------|
| · Sembrado | · Adición 4OHT (72h) | - | - | · Fijación · Tinción X-Gal | · Microscopía |

3.4.4 Ensayo de viabilidad con los sólidos finales S1-GAL y S1-GLU.

Con el objetivo de comprobar que las nanopartículas finales S1-GAL y S1-GLU no resultaban tóxicas para las células, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular reproduciendo las condiciones con las que luego se tratarían las células con los sólidos.

Para llevar a cabo el ensayo de viabilidad se realizó una siembra de la línea celular ITM en placa multipocillo de 24 pocillos. En el caso de las células vehículo no senescentes la

concentración de siembra fue de 40000 células/pocillo, y 150000 células/pocillo en el caso de las células senescentes tratadas con 4OHT, para conseguir un crecimiento similar al final del ensayo. El medio empleado fue DMEM suplementado con 10% FBS, 1mL/pocillo.

Los pasos seguidos durante el presente ensayo aparecen recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema por días del ensayo ‘Ensayo de viabilidad con los sólidos S1-GAL y S1-GLU’. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
|------------|-------|----------------------|-------|-------|---------------------------------|---------------------------|
| · Sembrado | - | · Adición 4OHT (72h) | - | - | · Adición S1-GAL y S1-GLU (24h) | · Tinción cristal violeta |

Tras la siembra, las células se incubaron durante 48 horas a 37°C y 5%CO₂, un periodo más largo que en el caso del ensayo anterior para garantizar una mayor adherencia celular.

Tras ese periodo se lavaron con PBS y se añadió 1 mL de medio DMEM suplementado con 0.5% FBS y con 4OHT 100 nM para inducir senescencia, inducción que duró 72 horas. En el caso de las células vehículo no senescentes se añadió la misma proporción de etanol en DMEM 0.5% FBS.

Tras las 72 horas de incubación se realizó un lavado con PBS para retirar el 4OHT, se volvió a añadir 1 mL de DMEM 10% FBS y se añadieron los sólidos S1-GAL y S1-GLU, suspendidos en PBS mediante previa sonicación. Las concentraciones finales en los pocillos fueron de 50 µg de sólido/mL. El diseño de la placa aparece recogido en la Figura 10.

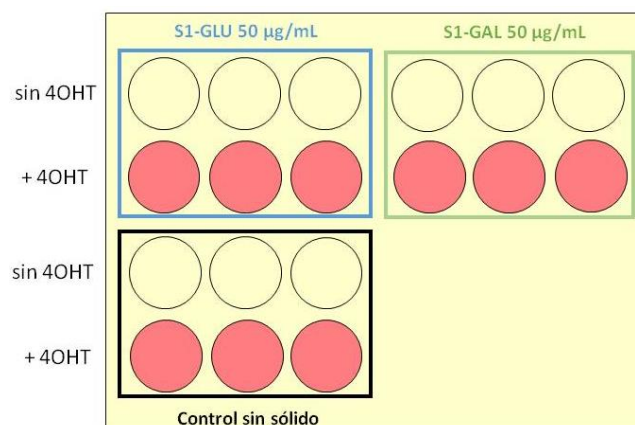


Figura 10. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Ensayo de viabilidad con los sólidos S1-GAL y S1-GLU’. Las filas primera y tercera son células control tratadas con etanol (vehículo en el que está disuelto el 4OHT), sembradas a una concentración de 40000 células/mL. Las filas segunda y cuarta son células senescentes por la adición de 4OHT 100 nM, sembradas a una concentración de 150000 células/pocillo. Las nanopartículas S1-GLU y S1-GAL se añadieron a 50µg/mL en los pocillos indicados. Unos pocillos se dejaron sin adición de nanopartículas para tenerlos como referencia de 100% de viabilidad. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

La incubación con las nanopartículas tuvo 24 horas de duración, momento en el que se procedió a la medida de la viabilidad celular. Para ello se retiró el medio celular y las células

fueron lavadas con PBS para retirar los sólidos y aquellas células muertas que habían perdido adherencia. De esta forma, solo aquellas células que estaban vivas y que por tanto conservaban la adherencia permanecieron en la placa. A continuación las células se fijaron con 500 μ L de PFA e incubación de 10-15 minutos a temperatura ambiente. El PFA fue después retirado y las células lavadas con PBS dos veces. El siguiente paso fue añadir 500 μ L de cristal violeta 0.5%, un colorante que se intercala en el DNA y extensamente empleado para ensayos de viabilidad celular (como queda revisado en Vega-Avila & Pugsley, 2011). Las células se incubaron con dicho colorante 45 minutos – 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado ese tiempo se retiró el cristal violeta a un contenedor de residuos líquidos citotóxicos y se lavaron los pocillos con agua de grifo hasta que las células dejaron de liberar colorante y el agua comenzó a salir transparente. En ese momento la placa se secó con secador para eliminar las gotas de agua residuales y se añadieron 500 μ L de ácido acético 10%. La placa se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos, en agitación para que el colorante destiñese. Finalmente, pasado este tiempo se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Scientific Multiskan FC Multimode Plate Reader a 595 nm.

3.4.5 Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes.

Una vez validado el modelo celular y probada la inocuidad de los sólidos, se procedió a determinar la especificidad de ambas nanopartículas hacia células senescentes y no senescentes. Para ello se añadieron los sólidos a ambas condiciones celulares, y se cuantificó la liberación de rodamina B por microscopia confocal.

La línea celular ITM se sembró en placas multipocillo de 24 pocillos sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro. La concentración de siembra fue de 40000 células/pocillo en el caso de las células control, y 150000 células/pocillo en el caso de las células que serían tratadas con 4OHT. El medio empleado fue DMEM suplementado con 10% FBS, 1mL/pocillo.

Tras 48 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ se cambió el medio a DMEM suplementado con 0.5% FBS y se añadió 4OHT disuelto en etanol a concentración 100 nM, y la misma proporción de etanol a las células vehículo no senescentes. Las células fueron incubadas durante 72 horas. El esquema de los pasos que se siguieron aparece recogido en la Tabla 3.

Tabla 3. Esquema por días del ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes’. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
|------------|----------------------|-------|-------|--|------------------------|
| · Sembrado | · Adición 4OHT (72h) | - | - | · Adición S1-GAL y S1-GLU (6h) · Fijación | · Microscopía confocal |

Pasadas las 72 horas de incubación con 4OHT se llevó a cabo la adición de los sólidos S1-GAL y S1-GLU. Primeramente se lavaron las células para retirar el 4OHT y se volvió a añadir DMEM 10% FBS. Posteriormente se preparó una suspensión de sólido en PBS, se sonicó bien y se añadió a las células a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siguiendo el diseño de placa representado en la Figura 11.

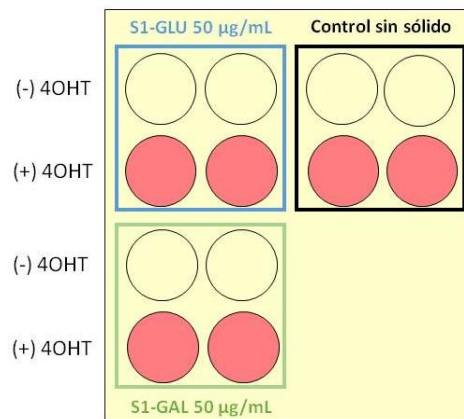


Figura 11. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación de los sólidos S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes’. Las filas primera y tercera son células control tratadas con etanol (vehículo en el que está disuelto el 4OHT), sembradas a una concentración de 40000 células/mL. Las filas segunda y cuarta son células senescentes por la adición de 4OHT 100 nM, sembradas a una concentración de 150000 células/pocillo. Las nanopartículas S1-GLU y S1-GAL fueron añadidas en los pocillos indicados a una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Controles sin adición de nanopartícula se dejaron para medir la autofluorescencia basal de las células. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

Tras 6 horas de incubación con las nanopartículas, los sólidos se retiraron mediante un lavado con PBS. A continuación las células se fijaron con 500 μL de PFA y se incubaron 10-15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se retiró la solución de PFA, se lavó con PBS dos veces y se volvió a añadir 1 mL nuevo de PBS, con el que se guardó la placa en nevera a 4°C hasta el día de su observación en el microscopio confocal.

Previo a la observación en el microscopio se procedió a la tinción de los núcleos celulares con el marcador DAPI. Para ello, se añadieron 300 μL de DAPI 300 nM a cada pocillo y se incubaron las células durante 3 minutos a 37°C. Finalmente se retiró el DAPI, se lavaron los pocillos con PBS y se realizó el montaje de los cubreobjetos de cristal en el portaobjetos tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.3. Las células se observaron y fotografiaron finalmente

en el microscopio confocal Zeiss Axio Observer Z1 con detector LSM 780 (condiciones de láser: 1.8% a 405 nm para el DAPI, 2% a 514 nm para la rodamina B, zoom 1.0).

3.4.6 Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa.

Una vez se comprobó la especificidad del sólido S1-GAL por las células senescentes y se determinaron los valores estándar de su internalización, se estudió si la adición de un azúcar cuya composición incluía galactosa (lactosa) reducía la internalización de dichas nanopartículas, especialmente en el caso de las células senescentes. Este ensayo se realizó a modo de prueba de concepto, como un primer paso a la hora de validar la teoría de que las células senescentes sobreexpresan algún tipo de receptor específico por azúcares, concretamente por galacto-oligosacáridos que contengan galactosa, ya que esto podría explicar la mayor internalización del sólido S1-GAL que se produce en éstas células.

Las células ITM se sembraron exactamente en las mismas condiciones empleadas en el ensayo 3.4.5: en placa de 24 pocillos sobre cubreobjetos, a concentraciones de 40000 células/pocillo en el caso de los controles y 150000 células/mL en el de las células senescentes, en DMEM con 10% FBS. Asimismo la inducción de senescencia con 4-hidroxitamoxifeno se llevó a cabo en las mismas condiciones de tiempo y concentración.

Pasadas las 72 horas de incubación con 4OHT se retiró el medio celular y los pocillos se lavaron con 1 mL de PBS para retirar el 4OHT. A continuación se añadió 1 mL de DMEM 10% FBS suplementado con diferentes concentraciones de lactosa (0, 0.03, 0.3, 3 y 6 mM) y se dejó incubando durante 2 horas. El diseño de la placa de ensayo se muestra en la Figura 12.

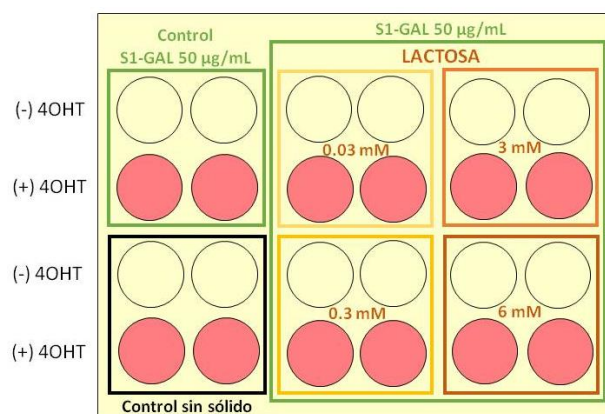


Figura 12. Diseño de la placa multipocillo para el ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa’. Las filas primera y tercera son células control tratadas con etanol (vehículo en el que está disuelto el 4OHT), sembradas a una concentración de 40000 células/mL. Las filas segunda y cuarta son células senescentes por la adición de 4OHT 100 nM, sembradas a una concentración de 150000 células/pocillo. Las nanopartículas S1-GAL fueron añadidas en los pocillos indicados a una concentración final de 50 µg/mL. El disacárido lactosa fue añadido en los pocillos y a las concentraciones indicados. Controles sin adición de nanopartícula fueron dejados para medir la autofluorescencia basal de las células. Controles sin adición de lactosa fueron dejados para medir la internalización normal de S1-GAL. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

Pasada la incubación con la lactosa se añadieron las nanopartículas S1-GAL a una concentración final en el pocillo de 50 µg/mL, previamente suspendidas en PBS y sonicadas. Las células se incubaron durante 6 horas con las nanopartículas, tiempo tras el cual se retiró el medio y se eliminaron los restos de sólidos mediante lavado con 1 mL de PBS. Finalmente las células se fijaron con PFA 4% mediante el mismo protocolo seguido en el ensayo 3.4.5, y la placa se guardó a 4°C hasta el momento de su observación en el microscopio. El resumen de todo el proceso descrito aparece expuesto en la Tabla 4.

Tabla 4. Esquema por días del ensayo ‘Cuantificación de la internalización y liberación del sólido S1-GAL en células senescentes y no senescentes pre-tratadas con lactosa’. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 |
|------------|----------------------|-------|-------|---|------------------------|
| · Sembrado | · Adición 4OHT (72h) | - | - | · Adición lactosa (2h) · Adición S1-GAL (6h) · Fijación | · Microscopía confocal |

El día de observación se tiñeron los núcleos de las células con 300 µL/pocillo de DAPI 300 nM e incubación durante 3 minutos a 37°C. Tras la retirada del DAPI y un lavado con PBS, se procedió al montaje de los cristales sobre portaobjetos como se ha descrito previamente, y se observaron y fotografiaron las células en el microscopio confocal Zeiss Axio Observer Z1 con detector LSM 780 (condiciones de láser: 1,8% a 405 nm para el DAPI, 2% a 514 nm para la rodamina B, zoom 1,0).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron por duplicado o triplicado. En el caso de los ensayos celulares, cada ensayo constaba al menos dos réplicas de cada condición. Los resultados aparecen presentados como la media de las diferentes réplicas \pm la desviación estándar (s). Las diferencias entre condiciones se determinaron mediante análisis de la varianza (ANOVA), con un nivel de confianza del 95% LSD ($p < 0.05$). Los datos fueron analizados mediante el Software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI v.16.1.17 (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA).

4 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso global de obtención de los sólidos finales S1-GAL y S1-GLU, descrito en el apartado de Materiales y Métodos, consistió en un primer paso de síntesis de la estructura mesoporosa inorgánica MCM-41. Dicho material se cargó posteriormente con el colorante rodamina B, dando lugar así al material híbrido inorgánico-orgánico S1. Finalmente dicho sólido se funcionalizó con dos puertas moleculares diferentes, los oligosacáridos Galactan y Glucidex-47, capaces de tapar los poros del material manteniendo en su interior la rodamina B. Dichas moléculas que actúan como puertas son capaces de responder a estímulos externos (concretamente a los enzimas β -galactosidasa y pancreatina, respectivamente), de manera que pueden ser hidrolizadas a monosacáridos dejando así los poros libres para la liberación del colorante encapsulado.

El sólido S1-GAL funcionaría como un nanodispositivo capaz de dirigirse selectivamente a células senescentes, ya que éstas presentan un alto contenido en el enzima β -galactosidasa respecto a las células no senescentes (*senescent-associated β -galactosidase*, SA- β -gal). Este enzima es capaz de degradar la puerta molecular del sólido y liberar su contenido, que en este caso se trata del colorante rodamina B pero que en un futuro podría ser un fármaco citotóxico (Figura 13). La existencia de selectividad por parte de nanopartículas funcionalizadas con galacto-oligosacáridos (GOS) ya ha sido demostrada por miembros de este grupo, aunque con un azúcar diferente al Galactan (Agostini *et al.*, 2012). Si se comprobaba que las presentes nanopartículas S1-GAL también se dirigían selectivamente a células senescentes, se pretendía estudiar si dicha especificidad era debida únicamente a la presencia de SA- β -gal, o bien si podía deberse también a la existencia de receptores de azúcares específicos para galacto-oligosacáridos en la superficie de las células senescentes (que facilitasen la endocitosis de nanopartículas funcionalizadas con GOS, como se plantea en el presente trabajo). En la prueba de concepto para comenzar a estudiar dicha teoría se trataría de bloquear los hipotéticos receptores mediante la adición de un azúcar. Dicho azúcar debería constar de galactosa en su estructura, y las células no deberían poseer transportadores para su internalización, para garantizar su acción extracelular. Posteriormente se adicionarían las nanopartículas S1-GAL y se estudiaría si su internalización y apertura se veía reducida.

Por su parte, S1-GLU funcionaría como un control positivo, que se esperaba que liberase su contenido independientemente en células senescentes y no senescentes, dado que ambas presentan equitativamente el enzima lisosomal amilasa capaz de degradar la puerta molecular.

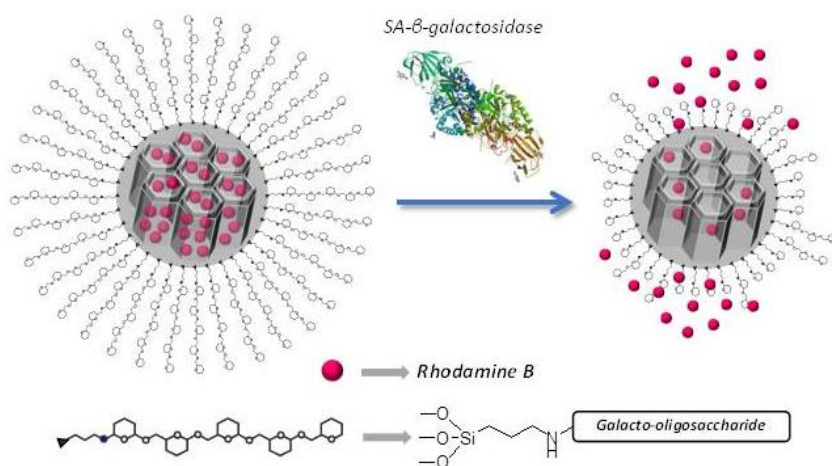


Figura 13. Esquema de una MCM-41 cargada con rodamin B y funcionalizada con un galacto-oligosacárido. Debido a la acción del enzima β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β -gal) el galacto-oligosacárido es hidrolizado y se libera la rodamin B, preferentemente en células senescentes con dicha actividad enzimática.

4.1 VALIDACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE S1-GAL Y S1-GLU

Las pruebas de caracterización y validación tienen el objetivo de comprobar que tanto las nanopartículas MCM-41 como los sólidos finales S1-GAL y S1-GLU sintetizados presentan las propiedades características de este tipo de materiales.

Por un lado se realizó una caracterización estructural, con la que se pretendió confirmar que la síntesis transcurrió correctamente y las nanopartículas presentaban la estructura tridimensional característica de MCM-41. Para ello se recurrió a técnicas como DRX, TEM y porosimetría por adsorción-desorción de N_2 . Por otro lado, mediante porosimetría, análisis elemental, TGA y cuantificación de rodamin B en las aguas de lavado se comprobó que los sólidos finales se habían cargado adecuadamente, y se cuantificó dicha carga de colorante. En cuanto a la validación funcional, se realizaron estudios de liberación *in vitro* con los sólidos en presencia y ausencia de los enzimas capaces de degradar las puertas moleculares. En ausencia del enzima se esperaba una “liberación cero”, signo de que la puerta era capaz de tapar los poros; y en presencia del enzima era de esperar una liberación controlada del colorante a medida que transcurría el tiempo, señal de que la nanopartícula respondía correctamente al estímulo de apertura de la puerta (es decir, que era funcional).

Para comenzar se realizaron los estudios de difracción de rayos X (DRX) y TEM para comprobar la correcta distribución espacial propia de la MCM-41 (Figuras 14 y 15).

En cuanto al difractograma de los sólidos (Figura 14), en a) se puede observar el patrón de difracción característico de una MCM-41 sin calcinar, en el que aparecen cuatro picos de Bragg

correspondientes a las cuatro reflexiones de bajo ángulo propias de la presente estructura hexagonal. En cambio, en la MCM-41 calcinada b) se observa un desplazamiento de dichos picos, que se debe a la contracción de la estructura del material por la condensación de los silanoles que se produce durante el proceso de calcinación. Sin embargo, a pesar de que este desplazamiento implica una pérdida parcial del orden, el mantenimiento de las reflexiones indica que se preserva la simetría mesoporosa. Finalmente, en c) y d) (correspondientes a los sólidos S1-GAL y S1-GLU respectivamente) desaparecen las 3 reflexiones menores, así como disminuye la señal de mayor intensidad, siendo esto signo de que se produce una reducción del contraste al estar los poros cargados de rodamina B. Aún así, el mantenimiento del primer pico sugiere que no se ha modificado sustancialmente la estructura mesoporosa hexagonal (Agostini *et al.*, 2012; Bernardos *et al.*, 2009).

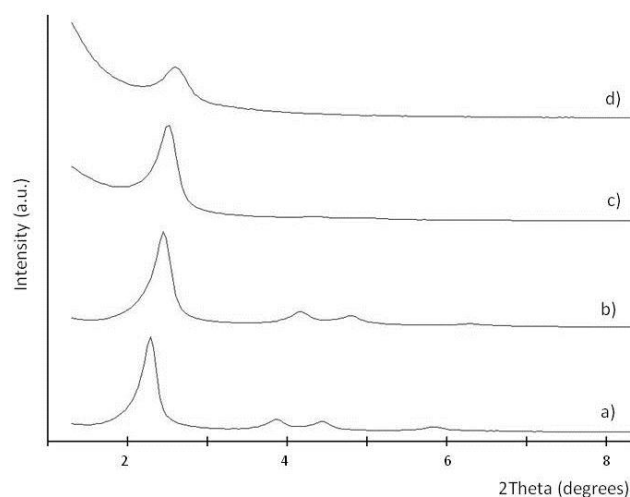


Figura 14. Difractograma de rayos X en polvo de MCM-41 sin calcinar a), MCM-41 calcinada b), S1-GAL c) y S1-GLU d). En a) y b) se observan las 4 reflexiones características de MCM-41. En c) y d) se pierden las 3 reflexiones menores debido a la carga de los materiales. En b), c) y d) el primer pico se desplaza hacia la derecha, debido a la compactación de los poros por la condensación de los silanoles tras la calcinación.

Como otra forma de comprobación adicional de la correcta estructura de los materiales, se observaron los sólidos en el microscopio electrónico de transmisión (TEM) (Figura 15). Así, se pudieron apreciar los canales y la porosidad hexagonal que conforman la MCM-41, confirmando la correcta síntesis. Esta confirmación fue de especial importancia en el caso de S1-GAL y S1-GLU (c) y d) respectivamente), ya que afirmaba el mantenimiento de la estructura hexagonal a pesar de haberse perdido las 3 reflexiones menores en el difractograma tras la carga de la nanopartícula con rodamina B. Asimismo se observa un mayor contraste de los poros en la MCM-41 calcinada b) respecto al resto de sólidos, ya que es el único sólido en el que los poros se conservan vacíos.

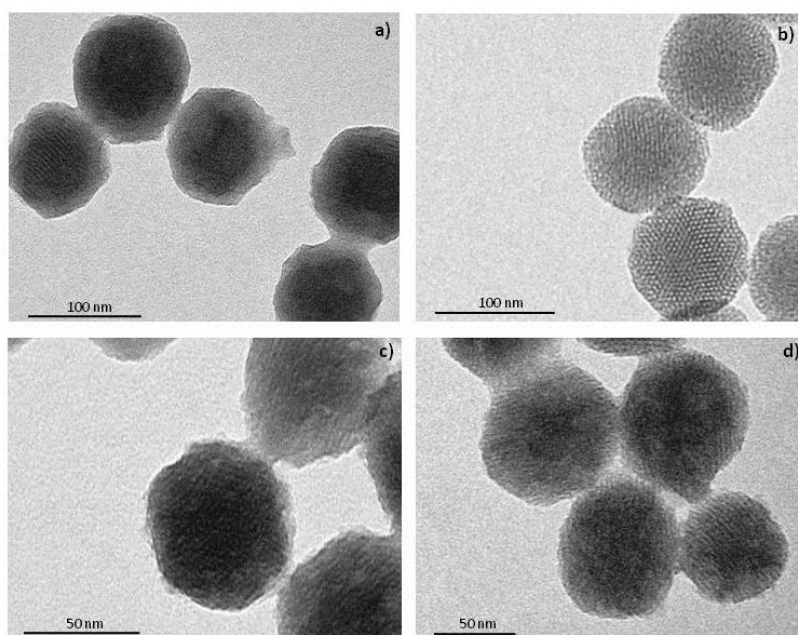


Figura 15. Fotografías representativas de MCM-41 sin calcinar a), MCM-41 calcinada b), S1-GAL c) y S1-GLU d), obtenidas por TEM. Se pueden observar los poros y canales hexagonales propios de la presente estructura mesoporosa, con mayor contraste en b) – dado que la MCM-41 calcinada tiene los poros libres – respecto a la MCM-41 sin calcinar (que aún contiene el tensoactivo CTAB en sus poros) y S1-GAL y S1-GLU (que contienen Rodamina B).

Así pues, teniendo en cuenta la información aportada por la difracción de rayos X en polvo y el TEM, se concluyó que la síntesis de los sólidos S1-GAL y S1-GLU fue correcta y que los materiales presentaban la estructura característica del material MCM-41.

Por otro lado, se analizaron las isothermas de adsorción-desorción de N_2 de los materiales MCM-41 calcinada, S1-GAL y S1-GLU (Figura 16), a partir de las cuales se obtuvo información sobre el tamaño, volumen y superficie específica de poro de los sólidos (Tabla 5).

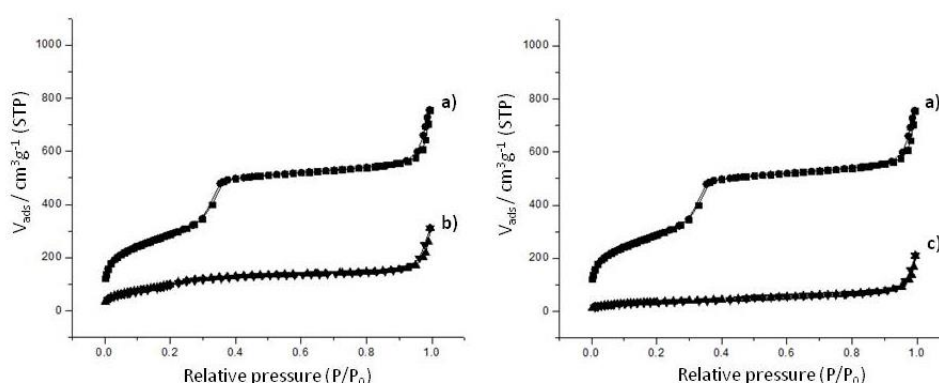


Figura 16. Isothermas de adsorción-desorción de N_2 de la MCM-41 calcinada a), S1-GAL b) y S1-GLU c). La MCM-41 calcinada muestra un aumento a bajas presiones parciales en la adsorción de N_2 , debido a la internalización del gas en los poros; mientras que los sólidos finales muestran una forma plana, signo de que los poros se encuentran bloqueados con el colorante rodamina B que impide la entrada de N_2 .

Tabla 5. Tamaño, volumen de poro (calculados mediante el método BJH) y superficie específica de poro (calculada mediante el modelo BET) de MCM-41 calcinada, S1-GAL y S1-GLU.

| Sólido | Tamaño de poro (nm) | Volumen de poro (cm ³ g ⁻¹) | Superficie específica (m ² g ⁻¹) |
|-------------------------|---------------------|--|---|
| MCM-41 calcinada | 2.51 | 0.72 | 995.6 |
| S1-GAL | - | 0.418082 | 372.6037 |
| S1-GLU | - | 0.266134 | 131.8791 |

Las isothermas obtenidas para MCM-41 (Figura 16, a)) son propias de este tipo de material. A presiones parciales bajas-medias ($P/P_0 < 0.3$) se observa un aumento del nitrógeno adsorbido debido a su condensación por capilaridad en los mesoporos, y a altas presiones parciales se vuelve a apreciar un aumento de la adsorción de N₂, isoterma conocida como de tipo IV. En el caso de los sólidos S1-GAL y S1-GLU (Figura 16, b) y c) respectivamente) no se observa un aumento aparente en la adsorción de nitrógeno a bajas presiones y la curva presenta una forma plana respecto a la de la MCM-41. Este hecho indica una reducción apreciable de la mesoporosidad, es decir, que los poros están correctamente bloqueados con rodamina B. Sin embargo, a altas presiones vuelve a observarse un aumento de la adsorción, signo de que la porosidad se conserva (Agostini *et al.*, 2012).

Estos estudios de porosimetría, junto con la disminución que se produce en el volumen de poro y en el área específica de los materiales finales respecto a la MCM-41 calcinada (**Tabla 5**), indican que el cargado de las nanopartículas con rodamina B ha tenido lugar correctamente: los poros de los materiales funcionalizados están llenos de colorante y por tanto la capacidad de adsorción de N₂ es menor.

Por último, para lograr una cuantificación más exacta del contenido de rodamina B encapsulado en los poros y de la cantidad de puerta molecular con la que se funcionalizaron los sólidos, se recurrió al análisis termogravimétrico, análisis elemental y a la cuantificación de rodamina perdida en las aguas de carga y lavado mediante espectroscopia de absorción UV/V (a la longitud de onda de máxima absorción de la rodamina B, $\lambda_{\text{máx}} = 555 \text{ nm}$). Los resultados obtenidos a partir de estos análisis fueron: para el sólido S1-GAL, 0.22 mmol rodamina B/g sólido y 97.82 mg Galactan/g sólido; y para el sólido S1-GLU, 0.20 mmol rodamina B/g sólido y 72.91 mg Glucidex-47/g sólido.

Una vez los sólidos estuvieron caracterizados estructuralmente se procedió a llevar a cabo su validación funcional, que se realizó mediante estudios de liberación *in vitro* de rodamina B.

Las liberaciones se llevaron a cabo en solución acuosa a pH 7.5 para simular las condiciones fisiológicas, en presencia y ausencia de un estímulo que fuese capaz de abrir la puerta

molecular. En el caso de S1-GAL el estímulo fue el enzima β -galactosidasa de levadura *Kluyveromyces lactis*, el cual es capaz de hidrolizar los enlaces glicosídicos que conforman el Galactan, puerta molecular de S1-GAL. En el caso de S1-GLU se recurrió al complejo enzimático pancreatina, que contiene diferentes enzimas hidrolíticos entre los que destaca la amilasa, capaz de hidrolizar el almidón que compone la puerta molecular de S1-GLU (Glucidex-47). Los resultados de los estudios de liberación se muestran en la Figura 17.

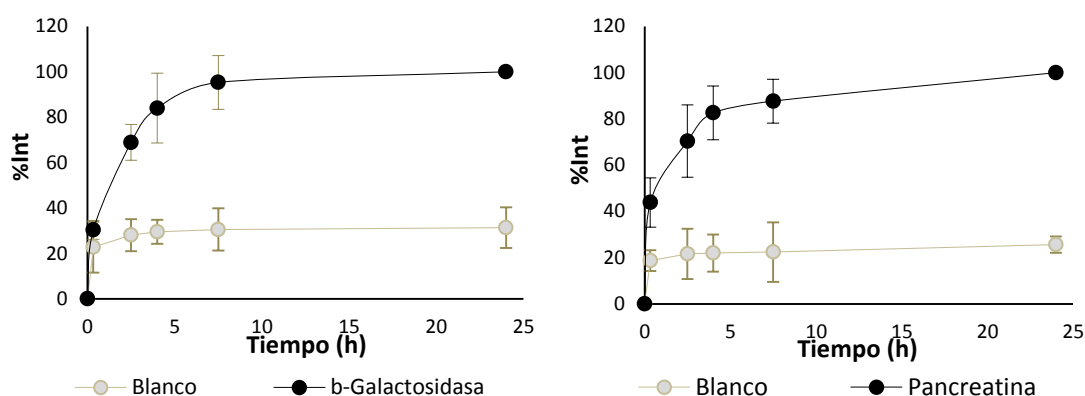


Figura 17. Liberación de rodamina B en S1-GAL (izquierda) y S1-GLU (derecha), en presencia y ausencia (blanco) de los enzimas β -galactosidasa y pancreatina respectivamente. En los blancos se observa una liberación de rodamina B mínima, mientras que en presencia del estímulo enzimático se observa una liberación mucho mayor que alcanza su máximo a las 24 horas. La liberación de colorante se midió mediante fluorescencia a $\lambda_{\text{emisión}} = 580 \text{ nm}$. Los valores están representados como media \pm s.

En la Figura 17 se muestra cómo en las condiciones de blanco, en las que no había presente enzima capaz de hidrolizar la puerta molecular de los sólidos, la liberación de rodamina B es próxima a cero, señal de que las puertas bloquean correctamente los poros y son capaces de retener el colorante contenido en su interior. Sin embargo, se observa una mínima liberación en ausencia de enzima, que puede ser debida a la presencia de restos de rodamina B adsorbida en la superficie de los sólidos que no pudieron ser eliminados mediante los lavados. En cambio, en presencia del estímulo enzimático se observa una liberación mucho mayor de colorante, notable ya a partir de las 2.5 horas (70% de la liberación máxima) y que alcanza su máximo a las 24 horas. Estos resultados demuestran que el anclaje de las puertas moleculares a la superficie de los sólidos cargados se llevó a cabo correctamente, que dichas puertas son capaces de bloquear los poros y que responden al estímulo para el cual estaban diseñadas.

Con todos los datos obtenidos se puede afirmar que los sólidos S1-GAL y S1-GLU presentan la estructura propia de una nanopartícula mesoporosa de sílice MCM-41 y son funcionales, por lo que se puede proceder a su empleo en sistemas celulares *in vivo*.

4.2 ENSAYOS CELULARES

Una vez se caracterizaron y validaron los sólidos S1-GAL y S1-GLU estructural y funcionalmente, se procedió a estudiar su respuesta en un sistema celular, concretamente en el modelo de senescencia constituido por la línea celular ITM y el compuesto 4-hidroxitamoxifeno (4OHT), capaz de inducir senescencia en dicha línea. Como ya se ha descrito en el apartado 3.4.2, la línea ITM contiene una fusión de la forma activa del oncogén MEK1 al dominio de unión a hormonas del receptor de estrógeno humano, modificado para que únicamente reconozca al análogo de estrógenos 4OHT. De esta forma, al añadir 4OHT se activa el oncogén y se desencadena una respuesta de senescencia inducida por oncogén.

Los primeros ensayos celulares se llevaron a cabo para comprobar que el modelo celular de senescencia inducida funcionaba. Para comenzar se realizó un ensayo de inducción de senescencia con 4OHT, y la inducción se comprobó a través de los cambios fenotípicos en las células y del ensayo colorimétrico con X-Gal, que se explicará a continuación. Una vez confirmado que el modelo era adecuado, se probó que las nanopartículas sintetizadas no fuesen tóxicas para las células, y se procedió a continuación a su validación funcional en cultivo celular. Para ello se añadieron las nanopartículas tanto a células senescentes y como no senescentes, y se observó y cuantificó la liberación de rodamina de ambos sólidos mediante microscopía confocal. Finalmente, se repitió este ensayo de microscopía confocal en este caso habiendo tratado a las células previamente con el disacárido lactosa, para estudiar si la adición de dicho azúcar afectaba a la internalización y apertura del sólido S1-GAL.

4.2.1 Comprobación del modelo celular de senescencia.

Uno de los rasgos propios de las células senescentes es su arresto del ciclo celular, por lo que no sintetizan DNA. Sin embargo, esta característica no puede emplearse para su detección, pues también está presente en otras células del organismo, como las quiescentes o las diferenciadas terminalmente. El rasgo fenotípico que las distingue de estas células que tampoco se dividen, y que ha sido extensamente empleado para su detección desde que fue descrito en 1995, es su actividad β -galactosidasa aumentada (Dimri *et al.*, 1995; Ithana *et al.*, 2013). Esta actividad se debe a un incremento en la masa lisosomal de las células senescentes, que posibilita la actividad de dicho enzima a un pH subóptimo de 6 en lugar de pH 4 – 4.5, al que suele funcionar de manera óptima normal (Kurz *et al.*, 2000). Así pues, este rasgo fue el empleado para comprobar que, siguiendo las condiciones descritas por Collado *et al.* (2005), efectivamente se inducía el fenotipo senescente en las células ITM.

El ensayo de detección de senescencia aprovechando la actividad SA- β -Gal se basa en la hidrólisis del sustrato permeable X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) por parte del enzima β -galactosidasa en condiciones de pH 6, liberándose un compuesto azulado detectable a simple vista. El sustrato X-Gal está compuesto por una molécula de galactosa, reconocida por el enzima β -galactosidasa, unida a 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol. Este último compuesto, al ser liberado por la hidrólisis, se oxida y dimeriza espontáneamente formando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo (Figura 18) (Burn, 2012), precipitado insoluble de color azul que tiñe las células senescentes. La clave del ensayo reside en el pH 6, que permite que a pesar de que todas las células presenten β -galactosidasa, solo las senescentes muestren actividad a este pH subóptimo debido al alto contenido del enzima.

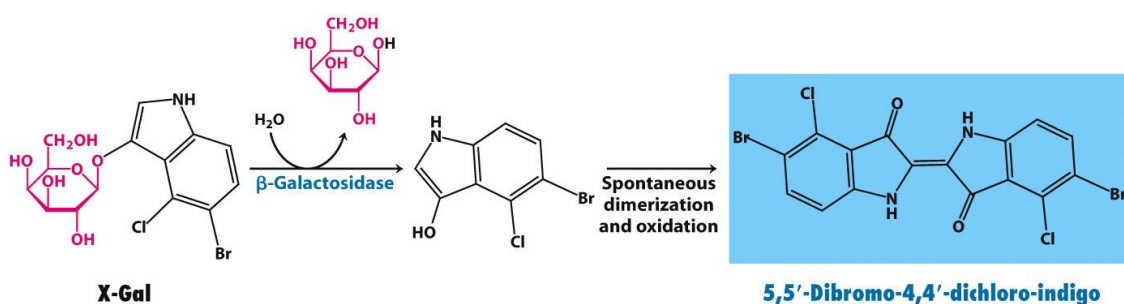


Figure 31.5
Biochemistry, Seventh Edition
 © 2012 W. H. Freeman and Company

Figura 18. Reacción de hidrólisis de X-Gal por el enzima β -galactosidasa y liberación de un compuesto azulado.

El ensayo se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.4.3, siendo clave la inducción de senescencia durante 72 horas con 4OHT 100 nM. Fotografías celulares tomadas al microscopio se muestran en la Figura 19. En ellas se observa cómo las células no senescentes (a, b y c) apenas muestran tinción azul, mientras que un alto porcentaje de las células a las que se les ha añadido 4OHT para inducir senescencia (d, e y f) presentan una fuerte coloración azulada. Los resultados de este ensayo indican pues que la inducción de senescencia con 4OHT fue eficaz. Asimismo, permiten apreciar los cambios fenotípicos que se producen en las células senescentes de la presente línea celular. Mientras que las células no senescentes presentan la morfología alargada en forma de huso característica de los fibroblastos, las células ITM senescentes se encogen y adquieren una forma redondeada, haciéndose más pequeñas. Así pues, el fenotipo de senescencia en este modelo celular es fácilmente reconocible, además las células presentan un gran número de pequeñas vesículas de endocitosis y se marca mucho el núcleo, que se ve más refringente y se observa poco citoplasma.

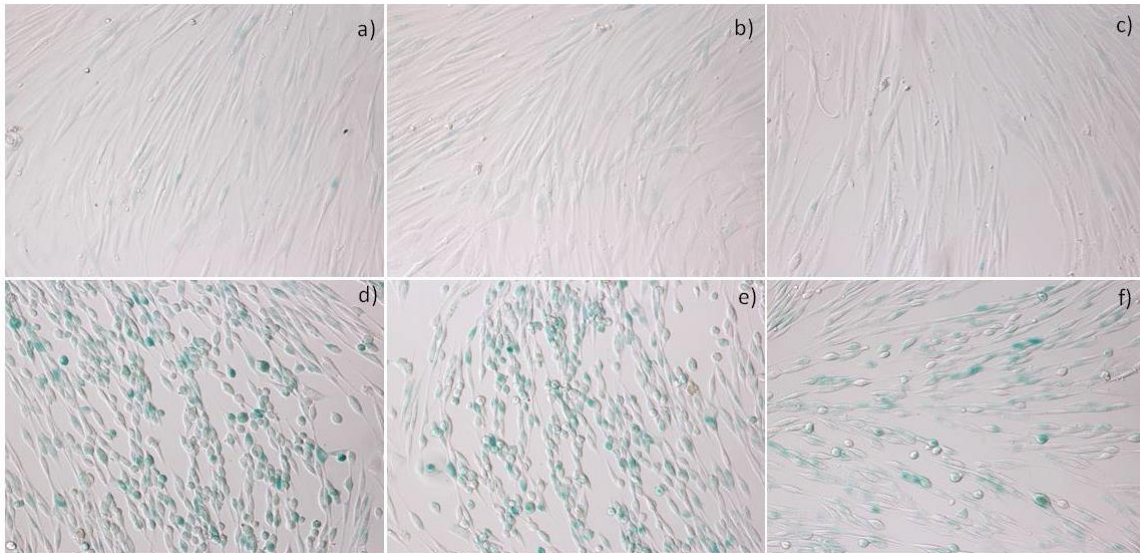


Figura 19. Imágenes representativas de la tinción con X-Gal de células no senescentes (sin 4OHT, a, b y c) y senescentes (con 4OHT, d, e y f). En las primeras se observa una tinción azulada muy reducida, frente al alto porcentaje de células teñidas en el caso de las células senescentes. 4OHT: 4-hidroxitamoxifeno.

4.2.2 Estudio de viabilidad celular con S1-GAL y S1-GLU.

A pesar de la experiencia del grupo de investigación con nanopartículas MCM-41 y de ya haberse comprobado que estos materiales son biocompatibles y no causan toxicidad celular (Agostini *et al.*, 2012; Bernardos *et al.*, 2010), se realizaron ensayos de viabilidad en las células ITM a 24 horas añadiendo los sólidos S1-GAL y S1-GLU a la concentración empleada en el resto de ensayos (50 µg/mL).

Como se expone en el apartado 3.4.4, para este ensayo se añadieron los sólidos S1-GAL y S1-GLU a células ITM no senescentes y senescentes (que habían sido incubadas 72 horas con 4OHT 100 nM). Tras 24 horas de incubación con las nanopartículas, la viabilidad celular se midió mediante tinción con cristal violeta. Los resultados se muestran en la Figura 20.

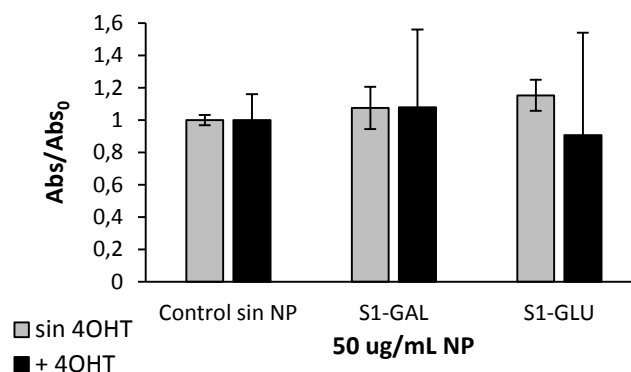


Figura 20. Ensayo de viabilidad de células senescentes (+4-hidroxitamoxifeno (4OHT)) y no senescentes (sin 4OHT) incubadas con S1-GAL (50 µg/mL) y S1-GLU (50 µg/mL) durante 24 horas. Los datos aparecen referenciados respecto a sus respectivos controles (senescentes y no senescentes sin nanopartículas), como media \pm s. En ninguna de las condiciones se observa una disminución apreciable de la viabilidad celular en las células tratadas con nanopartículas respecto a los controles ($p > 0.05$).

El ensayo de viabilidad corroboró el conocimiento del que ya disponía el grupo: las nanopartículas mesoporosas de sílice cargadas con rodamina B y funcionalizadas con galacto-oligosacáridos no generan toxicidad aparente a las concentraciones de trabajo, ni en células senescentes ni en no senescentes, como se pone de manifiesto en la Figura 20. Un hecho que destaca en la figura es que la desviación estándar en el caso de la viabilidad de las células senescentes es mucho mayor respecto a la correspondiente a las células no senescentes. Esto es debido a que las células senescentes pierden adherencia al adquirir su morfología más redondeada característica, dificultando así los estudios de viabilidad basados en adherencia, como el que se llevó a cabo. Aun así, el cristal violeta se planteó como el mejor método para determinar la viabilidad de las células, ya que otros métodos extendidos como son el WST-1 y MTT se basan en el metabolismo celular y está descrito que las células senescentes presentan un metabolismo mitocondrial alterado (Pérez-Mancera *et al.*, 2014), cosa que podría invalidar los resultados obtenidos a partir de dichos marcadores de viabilidad.

4.2.3 Internalización y apertura de S1-GAL y S1-GLU en células senescentes y no senescentes.

Para evaluar el nivel de internalización y apertura de los sólidos en las células, se incubaron durante 6 horas células senescentes (inducidas con 4OHT) y células control no senescentes con 50 µg/mL de cada sólido. La rodamina B liberada se cuantificó mediante el análisis de la fluorescencia de las imágenes celulares obtenidas por microscopía confocal con el paquete de programas de procesamiento de imagen Fiji. Para analizar las imágenes se fueron seleccionando individualmente las células, y el programa devolvió la media de la intensidad de fluorescencia del área seleccionada. En cada ensayo, y de cada condición, se tomaron al menos cuatro fotografías de dos réplicas distintas, y de cada imagen tomada se seleccionaron un mínimo de 6 células para el análisis. Con estos datos de intensidad de fluorescencia se calculó la media y la desviación estándar para las células senescentes y control, con S1-GAL y S1-GLU. El procesamiento de los datos incluyó la sustracción de la fluorescencia basal celular (autofluorescencia), calculada a partir de células senescentes y controles a las que no se les añadieron nanopartículas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21, y se expresan en porcentaje respecto a la intensidad máxima obtenida (correspondiente a la condición células senescentes incubadas con S1-GAL), pues los valores absolutos de intensidad varían según el día del ensayo.

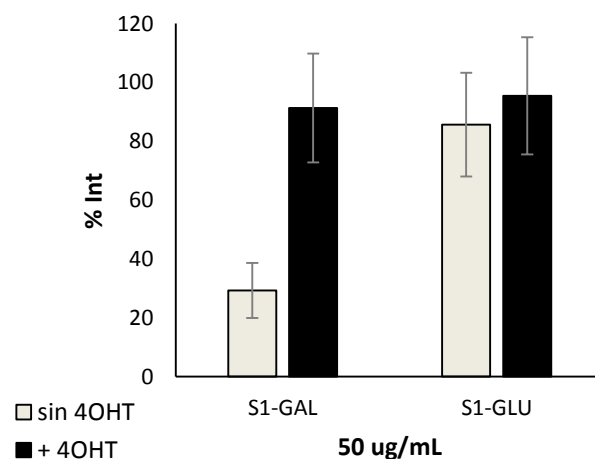


Figura 21. Liberación de rodamina B en células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+4-hidroxitamoxifeno (4OHT)) empleando las nanopartículas S1-GAL y S1-GLU (50 µg/mL). Los resultados aparecen referenciados respecto a la intensidad máxima, como media \pm s. En el caso de S1-GAL se observa una liberación de rodamina B tres veces mayor en las células senescentes respecto a las no senescentes, siendo estadísticamente significativa la diferencia ($p < 0.05$). En cambio, en S1-GLU no se observa una diferencia de liberación significativa entre células senescentes y controles ($p > 0.01$).

Como se esperaba, la nanopartícula S1-GLU libera su contenido indistintamente en células senescentes y células control. Esto se debe a que ambos tipos de células presentan cantidades similares del enzima amilasa, capaz de degradar el oligosacárido Glucidex-47 (hidrolizado de almidón) que constituye la puerta molecular (Agostini *et al.*, 2012). En cambio, en el caso del sólido S1-GAL se observa una diferencia significativa en la internalización y liberación de rodamina B entre las células control y las senescentes. Estas últimas presentan una liberación de rodamina tres veces mayor (3.14 veces) en comparación con las células control, mejorando el sólido S1-GAL la especificidad hacia células senescentes respecto al sólido de referencia previamente descrito por Agostini *et al.* (2012). Hasta donde alcanza el conocimiento actual, la explicación de dicho resultado radica en el mayor contenido en el enzima β -galactosidasa que presentan las células senescentes (SA- β -gal), que es la responsable de la degradación de la puerta que posee S1-GAL (el oligosacárido Galactan formado por galactosas). Imágenes representativas de las células sin nanopartículas y con ambos sólidos tomadas al microscopio confocal se muestran en la Figura 22.

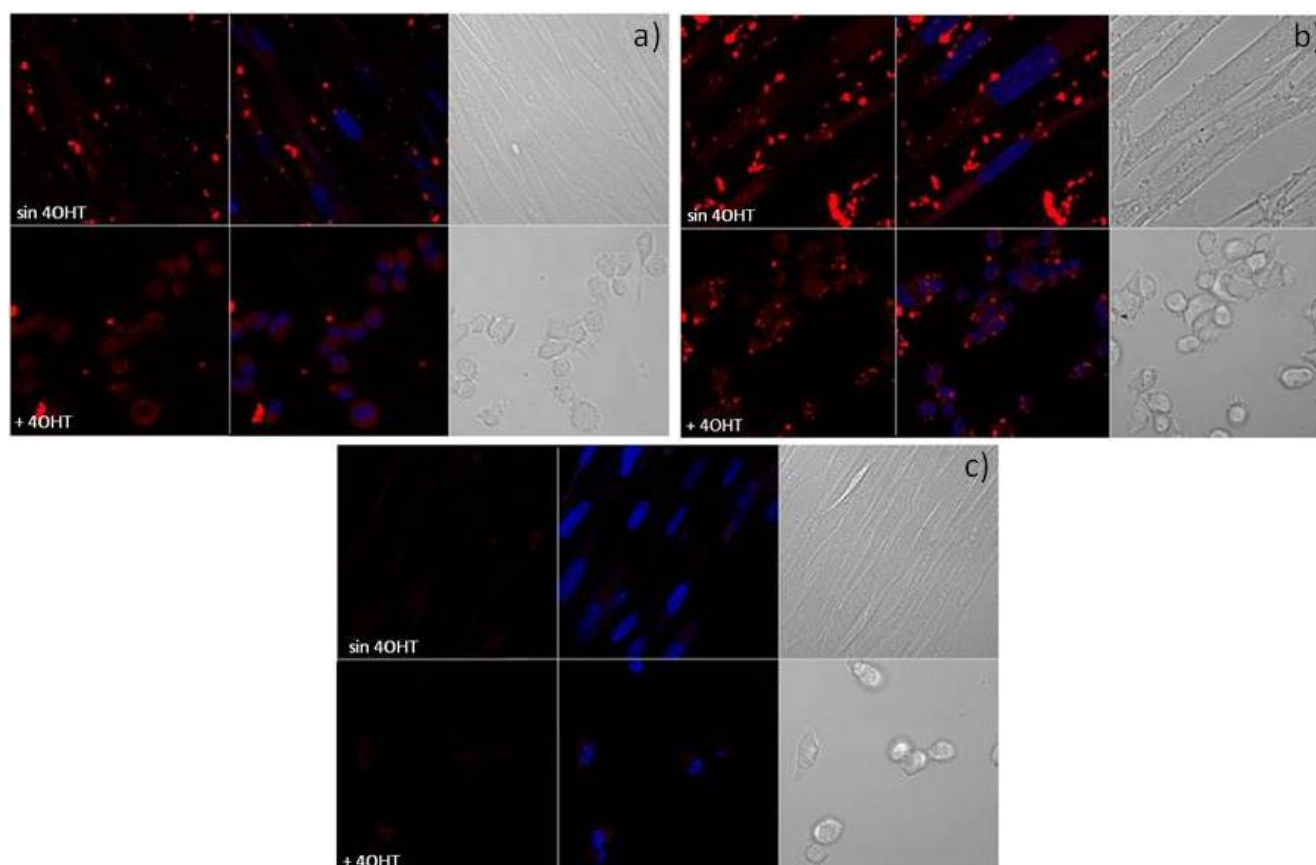


Figura 22. Fotografías representativas de células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+4-hidroxitamoxifeno (4OHT)) incubadas 6 horas con S1-GAL a), S1-GLU b), y sin nanopartículas c), tomadas al microscopio confocal.

Sin embargo, como ya se ha introducido en este trabajo, se plantea que la diferencia observada entre células senescentes y no senescentes incubadas con S1-GAL puede que no se deba únicamente a la actividad SA- β -gal, sino que es posible que exista un componente de especificidad extracelular en las células senescentes: receptores de galacto-oligosacáridos de tipo galectina. A modo de prueba de concepto, para probar dicha teoría se planteó un ensayo en el que se bloquearían dichos receptores previamente a la incubación de las células con nanopartículas. Este bloqueo se llevó a cabo mediante la adición, e incubación durante dos horas, de un azúcar que contenía galactosa y para el que no existían transportadores celulares descritos, garantizándose así su acción de manera extracelular. El azúcar elegido fue el disacárido lactosa (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc) por su disponibilidad y bajo coste, y se estudió a cuatro concentraciones distintas (0.03, 0.3, 3 y 6 mM). El ensayo transcurrió tal y como se describe en el apartado 3.4.6, y el análisis de las imágenes tomadas en el microscopio confocal se realizó tal y como se ha descrito previamente en este mismo apartado. Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 23. En ella se observa cómo la internalización y apertura de S1-GAL se reduce significativamente en las células senescentes (+4OHT). La disminución de fluorescencia disminuye aproximadamente un 60% respecto al control de

células senescentes incubadas con S1-GAL sin pre-incubación con lactosa, y es apreciable en todas las concentraciones de lactosa probadas. En cambio, la adición de lactosa no afecta significativamente a la internalización y apertura de las nanopartículas en células no senescentes (sin 4OHT). Dicho resultado se puede explicar a partir de la hipótesis formulada: en células senescentes, donde existe una sobreexpresión de receptores de GOS, la adición de un azúcar consistente en galactosa (lactosa) bloquea dichos receptores y por tanto se reduce la internalización de S1-GAL. En cambio en células no senescentes, donde no existe esta presencia o sobreexpresión de galectinas que puedan ser bloqueadas por la lactosa, la internalización y apertura de S1-GAL no se ve afectada tras la adición de lactosa. De hecho, que tras el bloqueo de receptores de GOS no exista diferencia entre células senescentes y no senescentes sugiere que la diferencia previamente observada (en ausencia de lactosa) puede deberse únicamente a estos receptores y no a la actividad SA- β -gal (póster resumen en Anexo).

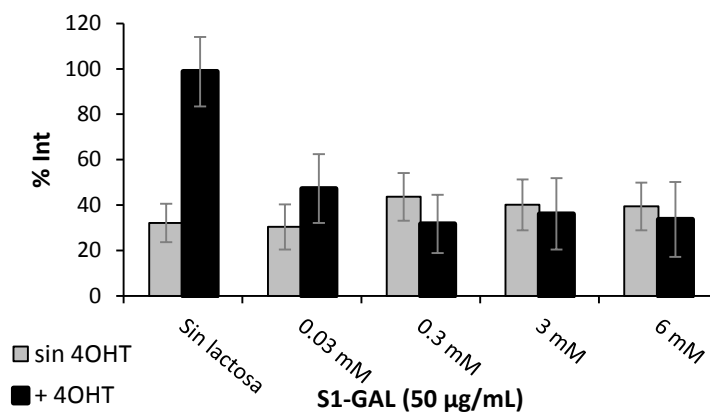


Figura 23. Liberación de rodamina B en células no senescentes (sin 4OHT) y senescentes (+4-hidroxitamoxifeno (4OHT)) pre-tratadas con lactosa empleando el sólido S1-GAL (50 µg/mL). Los resultados aparecen referenciados respecto a la intensidad máxima, como media \pm s. La fluorescencia no se ve afectada en las células no senescentes a pesar del pre-tratamiento con lactosa, mientras que en las células senescentes disminuye hasta un 60%, siendo estadísticamente significativa la diferencia ($p < 0.05$).

Sin embargo, a pesar de que los resultados sugieren que la hipótesis formulada puede ser cierta, se deben llevar a cabo más estudios que la confirmen de manera definitiva.

Para comenzar, debería probarse que dichos receptores son específicos para galacto-oligosacáridos, y no para otro tipo de azúcares carentes de galactosa. La lactosa está compuesta por galactosa y glucosa, por lo que se podría pensar que el bloqueo, y por tanto la especificidad de dichos receptores, fuese por acción de la glucosa. Sin embargo, tal y como hemos visto, únicamente el sólido S1-GAL (cuya puerta está compuesta por galactosa) muestra especificidad por las células senescentes. En cambio S1-GLU, cuya puerta está compuesta únicamente por glucosas, no muestra ningún tipo de especificidad por las células senescentes, probando esto que el *targeting* – y por tanto el bloqueo con lactosa – no se debe a la presencia de glucosa.

Aun así, y a modo de comprobación, se propone probar que la internalización y la liberación de la carga de S1-GAL no se vean afectadas por la incubación previa de las células con un azúcar carente de galactosa y que también actúe extracelularmente. Dado que Glucidex-47 es un hidrolizado de composición y peso molecular desconocidos, impidiendo esto el cálculo equimolar respecto a las concentraciones de lactosa empleadas anteriormente, se propone el disacárido sacarosa (α -D-Glc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Fru) como azúcar control incapaz de bloquear los receptores de azúcares en células senescentes. De esta forma se probaría que la especificidad y el bloqueo de la internalización del sólido se deben a la presencia de galactosa. Finalmente, como prueba adicional se debería estudiar que tanto la adición de lactosa como de sacarosa no afectan a la internalización y apertura de S1-GLU, pues la endocitosis de este sólido no va mediada por receptores de GOS, ya que su puerta molecular solo consta de glucosas.

Por otra parte, como se puede observar en la figura 23, no se aprecian diferencias en la disminución de la internalización de S1-GAL en las distintas concentraciones de lactosa probadas. Esto indica que dichas concentraciones se encuentran en el *plateau* final de bloqueo de receptores, en el que todos los receptores se encuentran bloqueados y no se puede conseguir una reducción de la internalización del sólido mayor. Se debería repetir el ensayo a concentraciones menores de lactosa, entre 0 y 0.03 mM, para conseguir la curva en la que a bajas concentraciones del disacárido no se observe bloqueo, a continuación se observe la caída de la liberación de rodamina B debida al bloqueo de los receptores, y finalmente se alcance el *plateau* en el que nos encontramos actualmente, donde todos los receptores se encuentran bloqueados y un aumento de la concentración del azúcar es incapaz de afectar la internalización de S1-GAL. La obtención de dicha curva permitirá comparar la especificidad de la lactosa por los receptores de las células senescentes frente a otros azúcares con galactosa, como el Galactan, y así podríamos ser capaces de encontrar aquellos galacto-oligosacáridos de mayor especificidad hacia células senescentes. De esta manera se podrían encontrar nuevos candidatos como puerta molecular del sólido S1 aquí sintetizado, y se podría conseguir un *targeting* todavía mayor al aquí logrado con el sólido S1-GAL.

El alcance de dicha meta permitiría el desarrollo de nanopartículas dirigidas hacia células senescentes de una manera incluso más específica que la alcanzada hasta ahora. Como ya se ha presentado en la Introducción, estas nanopartículas podrían ser empleadas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la acumulación de células senescentes, como el cáncer o la fibrosis pulmonar idiopática: actuarían de manera específica y con efectos secundarios reducidos, y en lugar de con rodamina B podrían ir cargadas con compuestos citotóxicos o letales capaces de eliminar las células senescentes, existiendo ya algunos descritos (Dörr *et al.*, 2013).

5| CONCLUSIÓN

Los ensayos realizados han permitido extraer las siguientes conclusiones...

1. Mediante el procedimiento metodológico seguido se ha conseguido diseñar, sintetizar y caracterizar correctamente dos nanodispositivos mesoporosos de sílice formados por el soporte inorgánico MCM-41, cargados con el fluoróforo rodamina B y funcionalizados con distintos polisacáridos como puerta molecular, obteniendo los sólidos finales S1-GAL y S1-GLU.
2. Dichos nanodispositivos son capaces de responder al estímulo enzimático externo para el que estaban diseñados, mostrando una liberación próxima a cero en su ausencia. Asimismo, han demostrado ser funcionales en los ensayos celulares, causando una toxicidad celular nula. El sólido S1-GAL ha probado ser específico para las células senescentes, mostrando una internalización y apertura en dichas células tres veces mayor a la obtenida en células no senescentes. Por su parte, S1-GLU no presenta ningún tipo de especificidad por las células senescentes, liberando su carga indiscriminadamente también en células control.
3. Finalmente, se ha podido demostrar mediante una prueba de concepto que en las células senescentes existe una expresión/sobreexpresión de receptores de galacto-azúcares que posibilitan la endocitosis del sólido S1-GAL, contribuyendo a su mayor internalización en células senescentes.

El trabajo realizado no solo desarrolla un nanodispositivo capaz de dirigirse selectivamente a las células senescentes, implicadas en un gran número de enfermedades. También aporta nueva información respecto a las características distintivas de dichas células, permitiendo en un futuro un mayor conocimiento de su fenotipo y abriendo la puerta al diseño de nuevos nanodispositivos que tengan una mayor selectividad y permitan reducir los efectos secundarios de los tratamientos farmacológicos dirigidos a la eliminación de células senescentes.

6 | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, A.; MONDRAGÓN, L.; BERNARDOS, A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; DOLORES MARCOS, M.; SANCENÓN, F.; SOTO, J.; COSTERO, A.; MANGUAN-GARCÍA, C.; PEONA, R.; MORENO-TORRES, M.; APARICIO-SANCHIS, R. & MURGUÍA, J. R. (2012). Targeted cargo delivery in senescent cells using capped mesoporous silica nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 51, 10556–10560.
- BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G. & HALENDA, P. P. (1951). The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. *Journal of the American Chemical Society*, 73, 373–380.
- BERNARDOS, A.; AZNAR, E.; MARCOS, M. D.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; SANCENÓN, F., SOTO, J.; BARAT, J. M. & AMORÓS, P. (2009). Enzyme-Responsive Controlled Release Using Mesoporous Silica Supports Capped with Lactose **. *Angewandte Chemie*, 121, 5998–6001.
- BERNARDOS, A.; MONDRAGÓN, L.; AZNAR, E.; MARCOS, M. D.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R.; SANCENÓN, F.; SOTO, J.; BARAT, J. M.; PÉREZ-PAYÁ, E.; GUILLEM, C. & AMORÓS, P. (2010). Enzyme-responsive intracellular controlled release using nanometric silica mesoporous supports capped with “saccharides.” *ACS Nano*, 4(11), 6353–6368.
- BAWARSKI, W. E.; CHIDLOWSKY, E.; BHARALI, D.J. & MOUSA, S.A. (2008). Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4, 273-282.
- BESANCENOT, R.; CHALIGNÉ, R.; TONETTI, C.; PASQUIER, F.; MARTY C.; LÉCLUSE, Y.; VAINCHENKER, W.; CONSTANTINESCU, S. N. & GIRAUDIER, S. (2010). A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: Implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS Biology*, 8(9), 1-11.
- BODNAR, A. G.; OUELLETTE, M.; FROLKIS, M.; HOLT, S. E.; CHIU, C. P.; MORIN, G. B.; HARLEY, C. B.; SHAY, J. W.; LICHTSTEINER, S. & WRIGHT, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279, 349–352.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H. & TELLER, E. (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American Chemical Society*, 60, 309–319.
- BURN, S. F. (2012). Detection of β -Galactosidase Activity: X-gal Satining. En *Kidney Development: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology (Vol. 886). Editorial Odysee Michos. New York: págs. 241-250.
- CAMPISI, J. (1997). Aging and cancer: the double-edged sword of replicative senescence. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45(4), 482–488.
- CAMPISI, J. (1997). The biology of replicative senescence. *European Journal of Cancer Part A*, 33(5), 703–709.
- CAMPISI, J. (2005). Aging, tumor suppression and cancer: High wire-act! *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 51–58.
- CAMPISI, J. & D’ADDA DI FAGAGNA, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8, 729–740.
- CHUPRIN, A.; GAL, H.; BIRON-SHENTAL, T.; BIRAN, A.; AMIEL, A.; ROZENBLATT, S. & KRIZHANOVSKY, V. (2013). Cell fusion induced by ERVWE1 or measles virus causes cellular senescence. *Genes and Development*, 27, 2356–2366.
- CLIMENT TEROL, E. (2012). Design of new hybrid materials: Study of its application in new detection formats and in controlled release applications. Tesis doctoral en Química. Editorial Universitat Politècnica de València.

- COLL, C.; BERNARDOS, A.; MARTÍNEZ-MÁÑEZ, R. & SANCENÓN, F. (2013). Gated silica mesoporous supports for controlled release and signaling applications. *Accounts of Chemical Research*, 46(2), 339–349.
- COLLADO, M.; GIL, J., EFEYAN, A.; GUERRA, C.; SCHUHMACHER, A. J.; BARRADAS, M.; BENGURÍA, A.; ZABALLOS, A.; FLORES, J. M.; BARBACID, M.; BEACH, D. & SERRANO, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436, 642.
- DAVIS, M. E.; CHEN, Z. G. & SHIN, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer, 7, 771–782.
- DIMRI, G. P.; LEE, X.; BASILE, G.; ACOSTA, M.; SCOTT, G.; ROSKELLEY, C.; MEDRANO, E.E.; LINSKENS, M.; RUBELJ, I.; PEREIRA-SMITH, O.; PEACOCKE, M. & CAMPISI, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9363–9367.
- DÖRR, J. R.; YU, Y.; MILANOVIC, M.; BEUSTER, G.; ZASADA, C.; DÄBRITZ, J. H. M.; LISEC, J.; LENZE, D.; GERHARDT, A.; SCHLEICHER, K.; KRATZAT, S.; PURFÜRST, B.; VALENTA, S.; MUELLER-KLIESER, W.; GRÄLER, M.; HUMMEL, M.; KELLER, U.; BUCK, A. K.; DÖRKEN, B.; WILLMITZER, L.; REIMANN, M.; KEMPA, S.; LEE, S. & SCHMITT, C. A. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, 501, 421–425.
- FIANDRA, L.; COLOMBO, M.; MAZZUCHELLI, S.; TRUFFI, M.; SANTINI, B.; ALLEVI, R.; NEBULONI, M.; CAPETTI, A.; RIZZARDINI, G.; PROSPERI, D. & CORSI, F. (2015). Nanoformulation of antiretroviral drugs enhances their penetration across the blood brain barrier in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11, 1387–1397.
- HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B. & GREIDER, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-460.
- HAYFLICK, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614–636.
- HAYFLICK, L. & MOORHEAD, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.
- HOENICKE, L. & ZENDER, L. (2012). Immune surveillance of senescent cells-biological significance in cancer-and non-cancer pathologies. *Carcinogenesis*, 33(6), 1123–1126.
- HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J. & FRÖBA, M. (2006). Silica-Based Mesoporous Organic – Inorganic Hybrid Materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45, 3216–3251.
- ITAHANA, K.; ITAHANA, Y. & DIMRI, G. P. (2013). Colorimetric detection of senescence-associated (beta)-galactosidase. *Methods Mol Biol*, 965, 143-156.
- KURZ, D. J.; DECARY, S.; HONG, Y. & ERUSALIMSKY, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113, 3613–3622.
- LIN, A. W.; BARRADAS, M.; STONE, J. C.; VAN AELST, L.; SERRANO, M. & LOWE, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes and Development*, 12, 3008–3019.
- MEDVEDEVA, N. V.; IPATOVA, O. M.; IVANOV, Y. D.; DROZHZHIN, A. I. & ARCHAKOV, A. I. (2007). Nanobiotechnology and Nanomedicine. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 1(2), 114–124.

- MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C. & MURRAY, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal*, 19, 311–330.
- MUÑOZ-ESPÍN, D.; CAÑAMERO, M.; MARAVER, A.; GÓMEZ-LÓPEZ, G.; CONTRERAS, J.; MURILLO-CUESTA, S.; RODRÍGUEZ-BAEZA, A.; VARELA-NIETO, I.; RUBERTE, J.; COLLADO, M. & SERRANO, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155, 1104–1118.
- MUÑOZ-ESPÍN, D. & SERRANO, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15, 482–496.
- NARDELLA, C.; CLOHESSY, J. G.; ALIMONTI, A. & PANDOLFI, P. P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Reviews. Cancer*, 11, 503–511.
- OVADYA, Y. & KRIZHANOVSKY, V. (2014). Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. *Biogerontology*, 15, 627–642.
- PÉREZ-MANCERA, P. A.; YOUNG, A. R. J. & NARITA, M. (2014). Inside and out: the activities of senescence in cancer. *Nature Reviews Cancer*.
- SERRANO, M.; LIN, A.W.; MCCURRACH, M.E. & BEACH, D. L. S. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. *Cell*, 88, 593–602.
- SLOWING, I. I.; VIVERO-ESCOTO, J. L.; WU, C.-W. & LIN, V. S.-Y. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1278–1288.
- STORER, M.; MAS, A.; ROBERT-MORENO, A.; PECORARO, M.; ORTELLS, M. C.; DI GIACOMO, V.; YOSEF, R.; PILPEL, N.; KRIZHANOVSKY, V.; SHARPE, J. & KEYES, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155, 1119–1130.
- VALLET-REGÍ, M.; RÁMILA, A.; DEL REAL, R. P. & PÉREZ-PARIENTE, J. (2001). A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chemistry of Materials*, 13, 308–311.
- VALLET-REGÍ, M.; RUIZ-GONZÁLEZ, L.; IZQUIERDO-BARBA, I. & GONZÁLEZ-CALBET, J. M. (2006). Revisiting silica based ordered mesoporous materials: medical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 16, 26–31.
- VALLET-REGÍ, M.; BALAS, F. & ARCOS, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46, 7548–7558.
- VAZIRI, H. & BENCHIMOL, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Current Biology*, 8, 279–282.
- VEGA-AVILA, E. & PUGSLEY, M. K. (2011). An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, 54, 10–14.
- WAGNER, V.; DULLAART, A.; BOCK, A.-K. & ZWECK, A. (2006). The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology*, 24(10), 1211–1217.
- YANG, P.; GAI, S. & LIN, J. (2012). Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 41, 3679–3698.

7. ANEXOS

GALACTO-OLIGOSACCHARIDE-GATED SILICA NANOPARTICLES FOR TARGETING SENESCENT CELLS

Regina Bou^{1,2,3}, Irene Galiana^{1,2,3}, Cristina Giménez^{1,2,3}, Elena Aznar^{1,2,3}, Félix Sancenón^{1,2,3}, M^a Dolores Marcos^{1,2,3}, José Ramón Murguía^{1,2}, Ramón Martínez-Mañez^{1,2,3}
¹ Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), Centro Mixto Universidad Politécnica de Valencia – Universidad de Valencia – rebopue@etsiamn.upv.es
² Departamento de Química, Ed. 5M, Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera s/n 46022 Valencia, España
³ CIBER-Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina, España

INTRODUCTION

Accumulation of senescent cells occur in several diseases, including cancer, idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) or type 2 diabetes. Thus, antisenescent therapies emerge as a novel therapeutic strategy.²

Mesoporous Silica Nanoparticles (MSNs) functionalized with galacto-oligosaccharides (GOS) have already been successfully used to target senescent cells,² taking profit of their increased β -galactosidase activity (**Figure 1**).³

However, this phenotypic characteristic alone may not totally explain the specificity of the targeting. Instead, the existence of an increased number of specific galactoside receptors in cell surface is hypothesized in this work. To test this, the internalization of GOS-gated silica nanoparticles in a cellular model of senescence will be studied, with previous blockage of those receptors by addition of lactose (galactose-containing disaccharide).

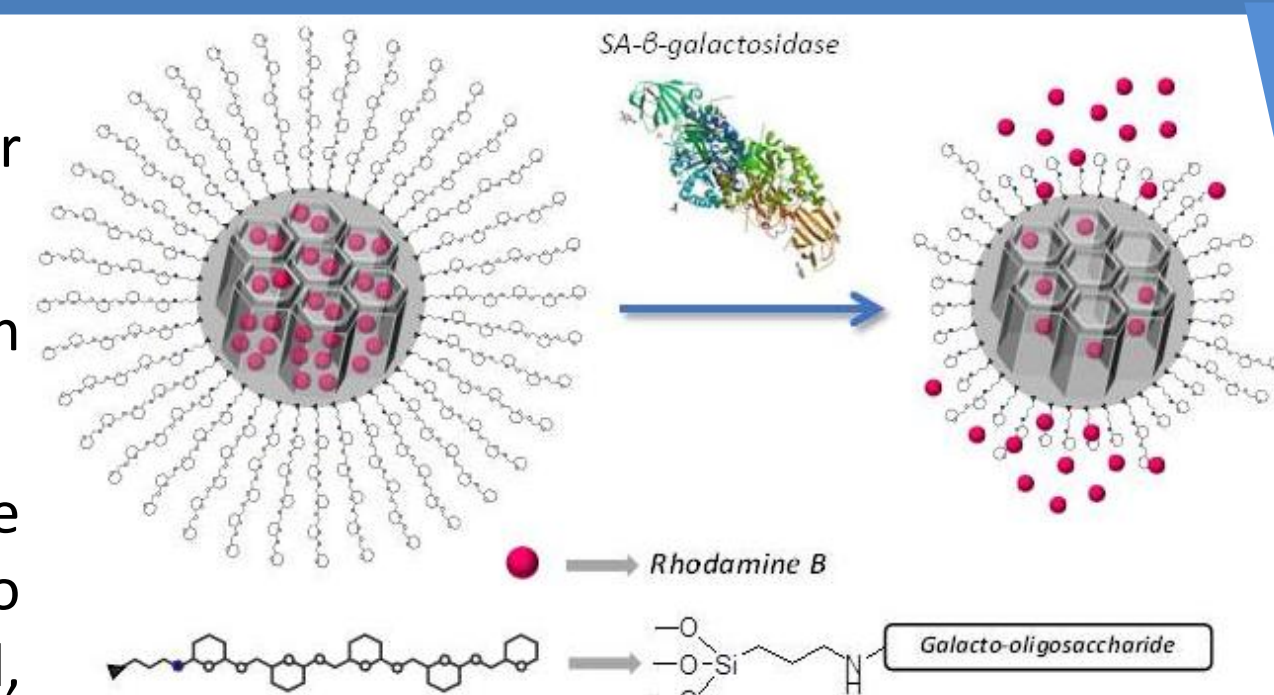


Figure 1. Cargo release upon hydrolysis of galacto-oligosaccharide capped MSNs by SA- β -gal.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF GALACTO-OLIGOSACCHARIDE-GATED SILICA NANOPARTICLES

MSNs were used as the inorganic scaffold, loaded with rhodamine B and functionalized with the oligosaccharide Galactan (six galactose monomers), synthesized as previously described.² The obtained solid, S1-GAL, was characterized by standard techniques (**Figures 2-4**).

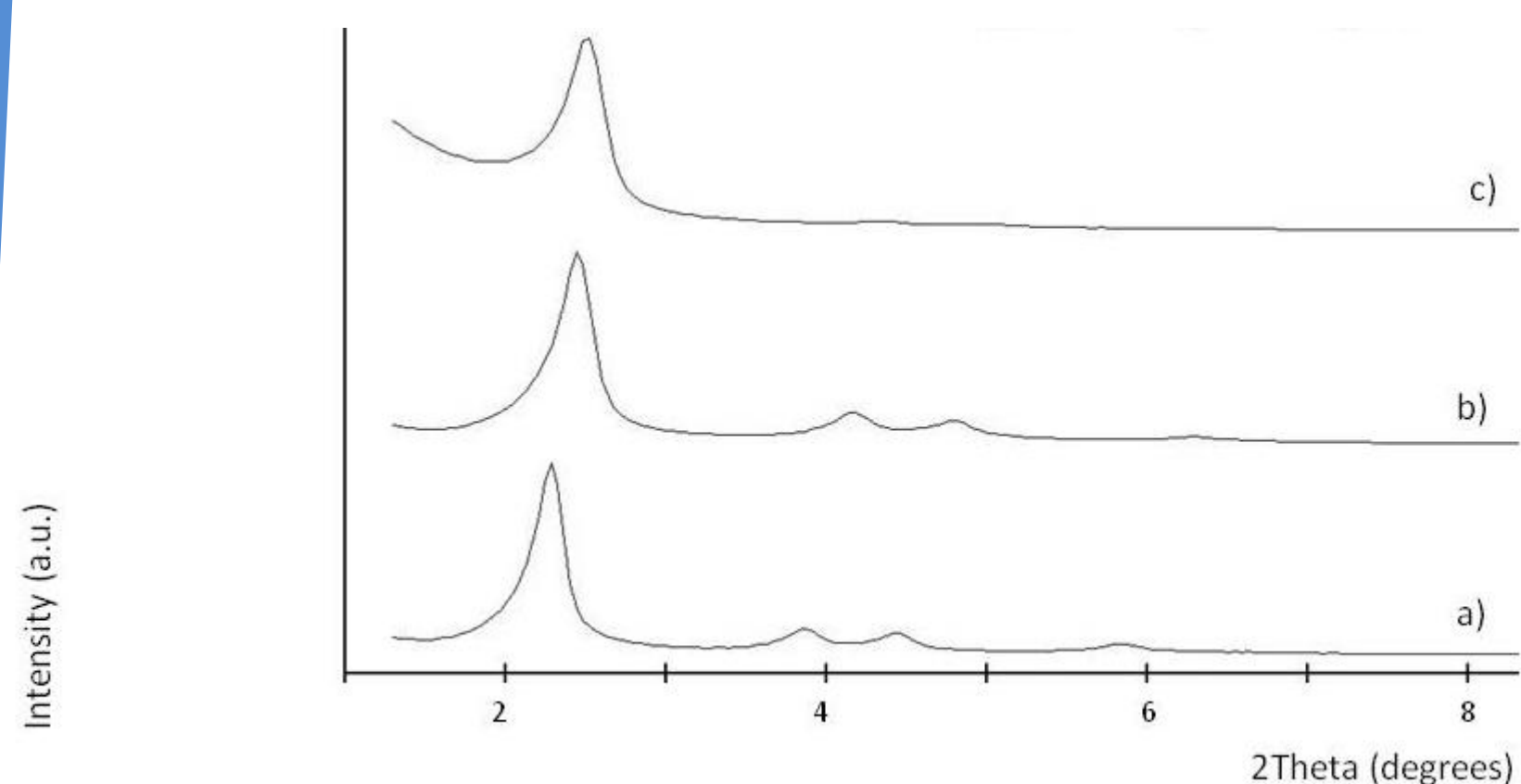


Figure 2. XRD patterns of MCM-41 as-synthesized a), calcinated MCM-41 b) and S1-GAL c).

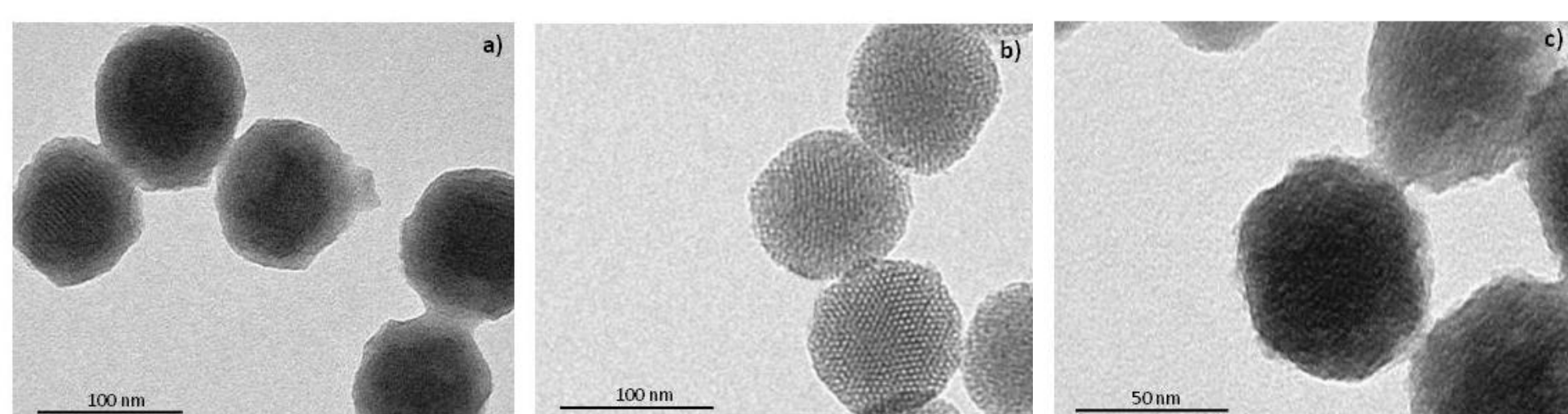
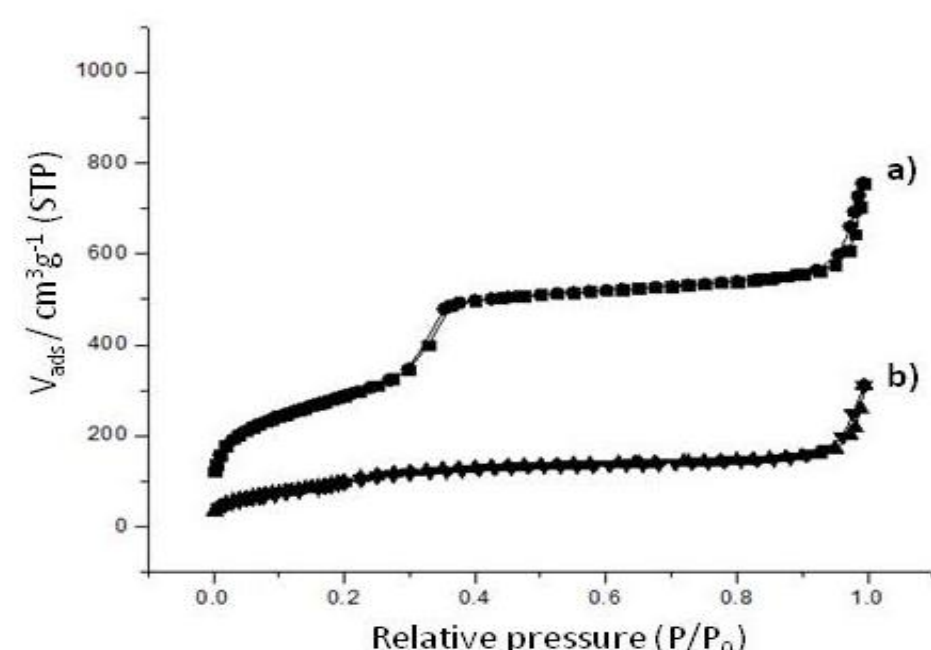


Figure 3. TEM images of MCM-41 as-synthesized a), MCM-41 calcinated b) and S1-GAL c).

Figure 4. N₂ adsorption-desorption isotherms of calcinated MCM-41 a) and S1-GAL b).



Rhodamine B content on S1-GAL amounts to 0.22 mmol/g nanoparticle.

The synthesized solid shows the structural properties characteristic of this kind of materials and a proper loading.

IN VITRO RELEASE STUDIES

To validate functionality of S1-GAL release studies were performed in the presence and absence of β -galactosidase, an enzyme able to hydrolyse the molecular gate of S1-GAL (**Figure 5**).

S1-GAL shows almost “zero delivery” in the absence of stimuli.

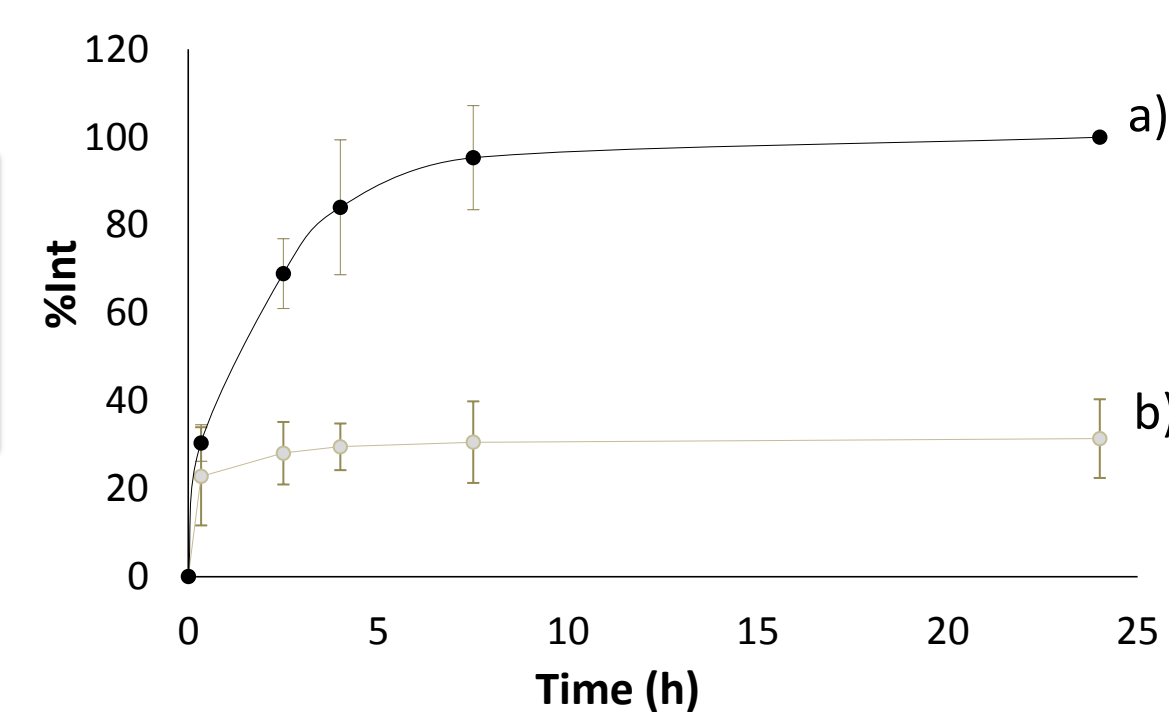


Figure 5. Rhodamine B release in presence a) and absence b) of β -galactosidase.

CELL ASSAYS

The model for cellular senescence was ITM cells (human pulmonary fibroblasts). ITM are transduced with a fusion of the oncogene MEK1 and a modified hormone-binding domain of the human oestrogen receptor. Upon addition of 4-hydroxytamoxifen (4OHT) an oncogene-induced senescence (OIS) response is triggered.⁴

ITM cells were incubated for 2 hours with lactose and then for 6 hours with S1-GAL (**Figure 6**).

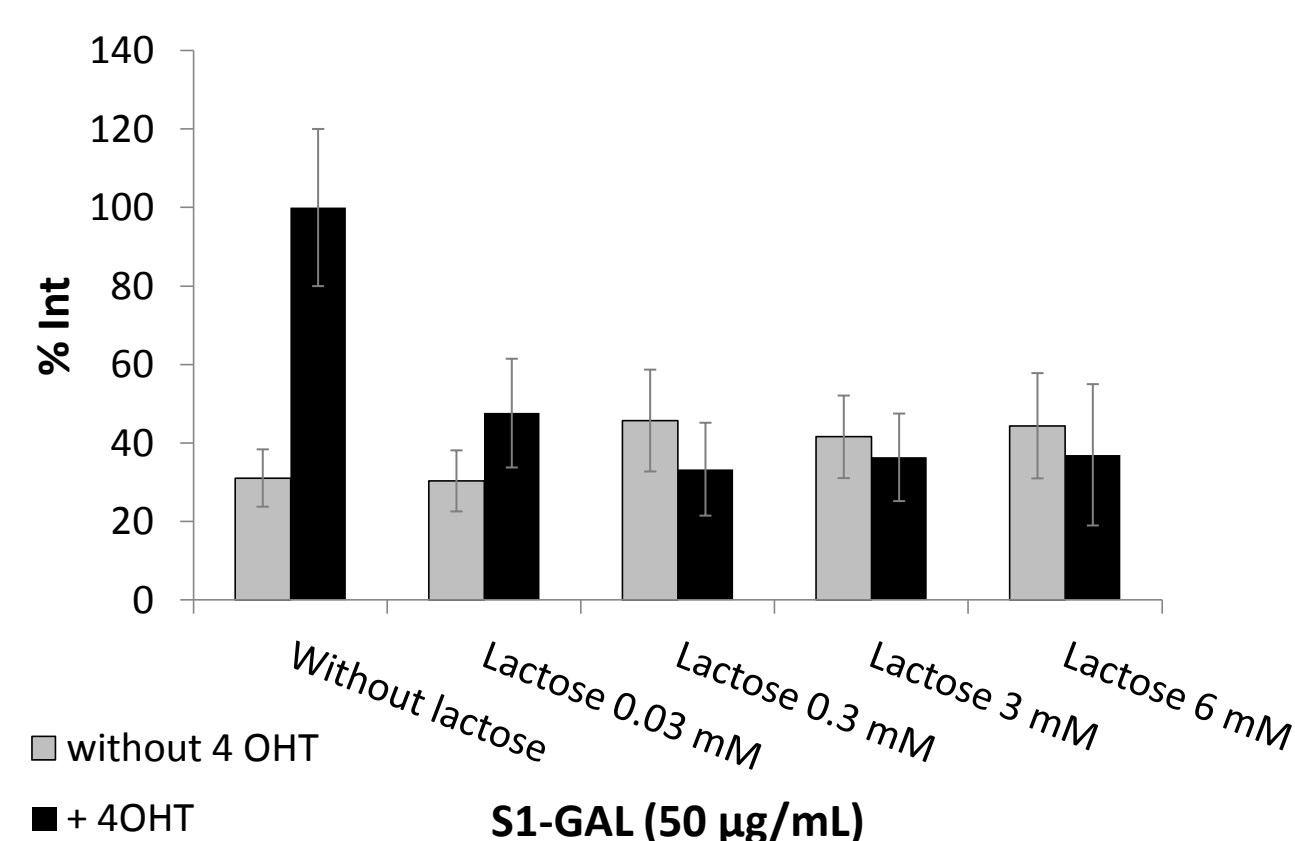


Figure 6. Rhodamine B release in senescent (+4OHT) and non-senescent (without 4OHT) cells at different lactose concentrations.

Rhodamine B fluorescence is 3-fold higher in senescent cells. Upon addition of lactose, no difference between S1-GAL internalization in senescent and normal cells is observed, consistent with the present hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Manuel Serrano from the Tumour Supression Group, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), for the ITM cell line. RB also thanks the Spanish Association Against Cancer Foundation (aecc) for her grant. CG thanks the Spanish Government for her FPU grant.

REFERENCES

- 1 D. Muñoz-Espín and M. Serrano, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, 15, 482.
- 2 A. Agostini *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10556.

- 3 G. Dimri *et al.*, *O. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, 92, 9363.
- 4 A. Collado *et al.* *Nature* **2005**, 436, 642.

